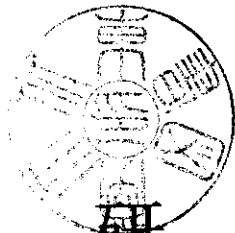


# ホタテガイのGnRHニューロンによるピテロゲニン合成と精子形成促進調節の分子機構

著者	尾定 誠
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/39767">http://hdl.handle.net/10097/39767</a>



# 研 究 成 果 報 告 書

---

ホタテガイの GnRH ニューロンによる  
ビテロゲニン合成と精子形成促進調節の分子機構

---

17580153

平成 17 年度～平成 19 年度科学研究費補助金  
(基盤研究 (C)) 研究成果報告書

平成 20 年 5 月

研究代表者 尾定誠

東北大学大学院農学研究科准教授

はしがき

海産二枚貝類の増養殖における効率的生産および質的改善のためには、優良な品種の作出が要求される。優良品種の獲得に不可欠な条件として、目的の品種、系統の母貝の交配のための同調した成熟産卵技術が挙げられる。すなわち、配偶子形成・産卵を調節している内分泌による生体内情報伝達系を解明することは、この技術を確立する上で不可欠な課題と考える。さらに、種苗生産成績のカギを握る卵質の良否の評価にもつながる重要な課題と考える。

本研究では、生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) ニューロンによる卵黄タンパク形成と精子形成に対する促進調節機能の全体像を明らかにすることを目的に、GnRHによるビテログニン合成と精原細胞増殖に対する具体的な促進機能の解析、GnRHによる卵巣と精巣内のエストロゲン合成細胞の活性化の可能性を検討した。さらに、エストロゲンシグナルの伝達に不可欠なエストロゲン受容体 (ER) cDNAを同定し、それらの卵巣・精巣・中枢神経における局在性を調べ、エストロゲンとGnRHとの関係をも明らかにし、その下流のビテログニン合成・精原細胞増殖調節の分子機構を検討した。

本補助金の支援によって、これまで卵巣と精巣を分けて進めてきた配偶子形成機構研究から、中枢神経の GnRH ニューロンを中心において雌雄での配偶子形成の内分泌調節機構の共通性と相違を明らかにすることができた。これは、世界に先駆けて配偶子形成制御技術を確立する意味で水産増殖学に大きく貢献するのみならず、生殖内分泌に関わる分子の分子・機能の進化を議論する上でも大きく貢献することができた。

## 研究組織

研究代表者：尾定誠（東北大学大学院農学研究科准教授）

研究分担者：Ishwar S Parhar（日本医科大学大学院医学研究科講師）

平成 17 年度分担

（研究協力者：千葉洋明、北里大学大学院水産学研究科助教授）

平成 18 年度協力

（研究協力者：南方宏之、㈱サントリー生物有機科学研究所研究員）

平成 19 年度協力

## 交付決定額（配分額）（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
平成 17 年度	1,600,000	0	1,600,000
平成 18 年度	1,000,000	0	1,000,000
平成 19 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総 計	3,600,000	300,000	3,900,000

## 研究発表

### （1）雑誌論文

1. Mitsuyo Kishida, Reiko Nakao, Apolonia Novillo, Ian P. Callard, Makoto Osada, Molecular cloning and expression analysis of cDNA fragments related to estrogen receptor from blue mussel, *Mytilus edulis*. Proceedings of the Japan Society for comparative endocrinology, 20, 75, 2005
2. M. Puinean, P. Labadie, E. M. Hill, M. Osada, M. Kishida, R. Nakao, A. Novillo, I. P. Callard and J. M. Rotchell, Laboratory exposure to 17 $\beta$ -estradiol fails to induce vitellogenin and estrogen receptor gene expression in the marine invertebrate *Mytilus edulis*. Aquat. Toxicol., 79, 376-383, 2006
3. Satoshi Nakamura, Makoto Osada and Akihiro Kijima, Involvement of GnRH neuron in the spermatogonial proliferation of the scallop, *Patinopecten yessoensis*.

Mol. Reprod. Dev., 74, 108-115, 2007

4. Makoto Osada, Satoshi Nakamura and Akihiro Kijima, Quantitative analysis of the pattern of gonial proliferation during sexual maturation in the Japanese scallop *Patinopecten yessoensis*. Fish. Sci., 73, 1318-1324, 2007

(2) 学会発表

1. 中尾令子、尾定誠、岸田光代、Apolonia Novillo、Ian P. Callard ; イガイ類から得られた 2 種類のエストロゲン受容体関連 cDNA 部分配列の解析、平成 17 年度日本水産学会大会、講演要旨集 No. 323
2. Makoto Osada, Satoshi Nakamura, Akihiro Kijima, Involvement of GnRH neuron in the spermatogonial proliferation of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. The 15th International Congress of Comparative Endocrinology, Boston Park Plaza Hotel, Boston, MA, USA, May 23-28, 2005.
3. Makoto Osada, Reiko Nakao, Mitsuyo Kishida, Apolonia Novillo, Ian P. Callard, Involvement of estrogen and estrogen receptor in oogenesis of bivalve Mollusks. The 15th International Congress of Comparative Endocrinology, Boston Park Plaza Hotel, Boston, MA, USA, May 23-28, 2005.
4. Reiko Nakao, Satoshi Nakamura, Akihiro Kijima, Makoto Osada, Involvement of GnRH-like peptide and estradiol-17 $\beta$  in vitellogenin synthesis in the ovary of scallop, *Patinopecten yessoensis*. The 15th International Congress of Comparative Endocrinology, Boston Park Plaza Hotel, Boston, MA, USA, May 23-28, 2005.
5. Satoshi Nakamura, Akihiro Kijima, Ishwar S. Parhar, Katsumi Aida, Makoto Osada, Immunolocalization of GnRH neurons in the cerebral and pedal ganglion of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. The 15th International Congress of Comparative Endocrinology, Boston Park Plaza Hotel, Boston, MA, USA, May 23-28, 2005.
6. Mitsuyo Kishida, Reiko Nakao, Apolonia Novillo, Ian P. Callard, Makoto Osada, Partial sequence of putative estrogen receptors in the bivalve Mollusk, *Mytilus edulis*. The 15th International Congress of Comparative Endocrinology, Boston Park Plaza Hotel, Boston, MA, USA, May 23-28, 2005.

7. Satoshi Nakamura, Akihiro Kijima, Ishwar S. Parhar, Katsumi Aida, Makoto Osada, Immunolocalization of GnRH neurons in the cerebral and pedal ganglion of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. Satellite Workshop of The 15th International Congress of Comparative Endocrinology; Reproductive endocrine system in Agnathans, Protochordates and others, University of New Hampshire, NH, USA, May 29-30, 2005.
8. 中村悟司、尾定誠、中尾令子、千葉洋明、木島明博；ホタテガイ精原細胞増殖におけるステロイドホルモンの関与と GnRH による合成調節、日本動物学会第 76 回大会（平成 17 年 10 月）、予稿集 1P179 (p130)
9. 岸田光代、中尾令子、Apolonia NOVILLO、Ian CALLARD、尾定誠；イガイ類の部分 ER c DNA クローニングと発現解析、第 30 回日本比較内分泌学会大会（平成 17 年 11 月 12、13 日、熊本）
10. Puinean, A.M., Labadie, P., Hill, E. M. Osada, M., Rotchell J. M., Laboratory exposure to 17 $\beta$ -estradiol fails to induce vitellogenin and estrogen receptor gene expression in the marine invertebrate *Mytilus edulis*. SETAC (Society of Environmental Toxicology and Chemistry)-Europe 16th Annual Meeting, The Hague, The Netherlands, 7-11 May 2006.
11. 中尾令子、中村悟司、木島明博、尾定誠；ホタテガイ卵黄タンパク前駆体 (Vtg) の合成調節における GnRH の関与、日本動物学会第 77 回大会（平成 18 年 9 月）、予稿集 4I0915 (p100)
12. 尾定誠、中尾令子、岸田光代；ホタテガイのビテログニン合成におけるエストロゲンシグナリングの関与、平成 19 年度日本水産学会大会、講演要旨集 No. 328
13. 尾定誠、中村悟司、千葉洋明；GnRH によるエストロゲン合成調節とホタテガイの精原細胞増殖の支配、平成 20 年度日本水産学会大会、講演要旨集 No. 1110

# 1. 精原細胞増殖の定量的なパターン解析

Fisheries Science, 73, 1318–1324, 2007

ホタテガイ *Patinopecten yessoensis* の配偶子形成をブロモデオキシウリジン (BrdU) の取り込みを指標にした生殖原細胞の有糸分裂活性によって定量的に解析した。卵原細胞と精原細胞は 12 月の成長期までは緩やかに増殖したが、1 月以降の成熟期からは卵巣では卵原細胞の増殖停止と卵母細胞へ分化と成長、精巣では著しい精原細胞の増殖と減数分裂が認められた。このパターンの変化から生殖原細胞増殖はフェーズ I と II に大別され、それぞれ異なる内分泌支配を受けている可能性が推察された。

## 2. 精原細胞増殖における GnRH ニューロンの関与

Molecular Reproduction and Development, 74, 108-115, 2007

ホタテガイの精原細胞増殖の定量的なパターン解析と培養精巣組織での精原細胞増殖の神経支配を検討した。核酸前駆体 BrdU の取り込みを免疫学的に検出し、有糸分裂活性をもつ精原細胞として同定した。卵原細胞と精原細胞が緩やかに増殖するフェーズ I と精原細胞だけが産卵期まで激しく増殖し、卵母細胞が著しい卵黄形成をしているフェーズ II に大別され、生殖細胞の増殖パターンが明らかになった。中枢神経系に抗哺乳類 GnRH (mGnRH) 抗体で検出されるホタテガイ GnRH 様ニューロンは、成熟期の雌雄の足部神経節に散在し、主に、頭部神経節の限られた領域に分布していた。また GnRH 様ニューロンの神経線維は中枢神経内から生殖巣へは伸びていなかった。雌雄の中枢神経抽出物は精原細胞増殖を強く促進したが、卵原細胞増殖には関与しなかった。このことは、フェーズ II に見られた精原細胞の増殖に中枢神経が大きく関与すると同時に、卵母細胞の卵黄形成への何らかの関与を示唆していた。精原細胞の有糸分裂の活性化は mGnRH によっても強く促進され、中枢神経抽出物による増殖促進効果は mGnRH と同様に抗 mGnRH 抗体と mGnRH アンタゴニストによって消失した。このことは、ホタテガイの中枢神経系に GnRH ペプチドが存在し、精原細胞増殖促進シグナルは GnRH 受容体を介したものであることが明らかになった。さらに、GnRH 様ニューロンから血球が運び屋となって精巣まで運ばれることが明らかとなったことから、フェーズ II での精原細胞増殖は中枢神経系の GnRH ニューロンの支配にあることが示唆された。



### 3. GnRHによるステロイドホルモン合成の調節

#### 実験方法

##### 培地への添加物

培地には1ウェルにつき、0.5個体分の煮沸したCPG抽出液、最終濃度が $1.0 \times 10^{-6}$  Mになるように調整したmGnRHを添加した。コントロールには培地のみで培養したものを用いて、ステロイドホルモン組織内濃度への影響を検討した。

ステロイドホルモンとして、E<sub>2</sub>、テストステロン、プロゲステロンをdimethylsulfoxide (DMSO) に溶解させたものを培地に最終濃度が $1.0 \times 10^{-5}$  Mとなるよう調整して添加した。コントロールは、0.01% (ステロイドホルモン添加実験区に含まれているものと同量となる) DMSO 培地を用いて、精原細胞増殖に対するステロイドホルモンの影響を検討した。さらに、 $1.0 \times 10^{-6}$  M mGnRH と $1.0 \times 10^{-5}$  M E<sub>2</sub>単独もしくはエストロゲンアンタゴニストICI 182,780存在下での効果も検討した。

##### ステロイドホルモン濃度計測用生殖巣の調整

ドライアイスで凍結し、計量した*in vitro* 培養生殖巣片を1.5 ml エッペンチューブに収容し、ジエチルエーテルを加えホモジナイズして抽出し、エーテル層を回収した。その後45 °C のウォーターバスで乾固して、ステロイド濃度計測まで4 °C で保存した。

##### 時間分解蛍光免疫法によるステロイドホルモン濃度計測

BSA 抗原を0.1 M sodium carbonate buffer で溶解し、プレートの各ウェルにプロゲステロン: 0.5 µg / ml、テストステロン: 0.05 µg / ml、E<sub>2</sub>: 0.02 µg / ml の濃度で分注し、4 °C で1晩静置した。3回ウェル洗浄液で洗浄後、0.1 % BSA 溶液でブロッキングし、ウェル洗浄液で3回洗浄し、アッセイ緩衝液、スタンダード溶液、アッセイ緩衝液で再溶解した雌雄生殖巣組織培養片の抽出済みステロイドホルモン測定用試料をそれぞれ50 µl ずつ分注した。そこにアッセイ緩衝液で希釈した抗ステロイドホルモン抗体を150 µl ずつ分注し、4 °C で一晩静置した。反応後ウェル洗浄液で3回洗浄し、Eu 標識をした2次抗体を分注し、室温で1時間震盪討論した。反応後ウェル洗浄液で3回洗浄し、増強試薬をすべてのウ

エルに分注し、5 分間震盪後、蛍光光度計で蛍光強度を測定した。検出された濃度は、生殖巣の湿重量で除して単位湿重量あたりのステロイドホルモン量として表した。

#### 抗 BrdU 抗体を用いた精巣組織切片の免疫染色

抗 BrdU 抗体を用いた精巣組織切片の免疫染色は、これまでと同様に行った。

#### 結果

卵巣ではプロゲステロン量は CPG 抽出液添加区、GnRH 添加区ともにコントロールと変わらなかったが、精巣ではコントロールと比較し CPG 抽出液添加区、GnRH 添加区は低下する傾向が見られた (Fig. 24)。テストステロン量は卵巣では CPG 抽出液添加区、GnRH 添加区はコントロールと変わらなかったが、精巣ではコントロールと比較し CPG 抽出液

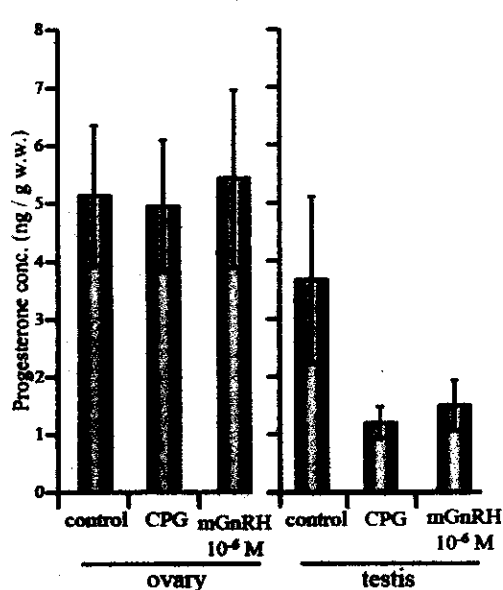


Fig. 24. *In vitro* effect of mGnRH and CPG on progesterone concentration (ng / g wet weight) in the gonad of scallop *P. yessoensis*. Each value represents the mean  $\pm$  SE (n = 4).

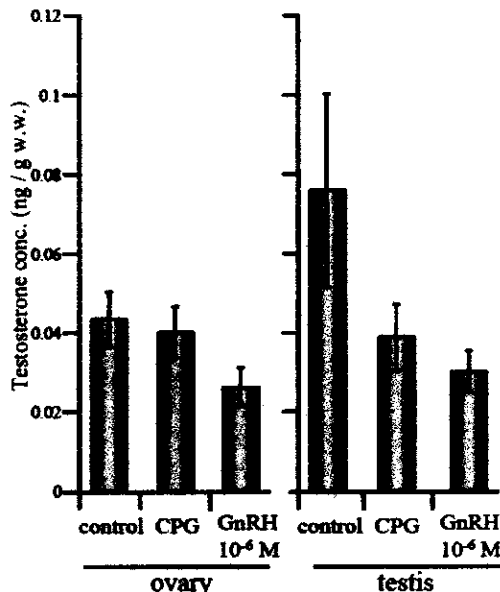


Fig. 25. *In vitro* effect of mGnRH and CPG on testosterone concentration (ng / g wet weight) in the gonad of scallop *P. yessoensis*. Each value represents the mean  $\pm$  SE (n = 4).

添加区、GnRH 添加区はともに低下する傾向が見られた (Fig. 25)。E<sub>2</sub> 量は卵巣では CPG 抽出液添加区、GnRH 添加区はコントロールと変わらなかったが、精巣では CPG 抽出液添加区ではコントロールとほぼ同程度の値を示したが、それに比べ GnRH 添加区は増加する傾向が見られた (Fig. 26)。

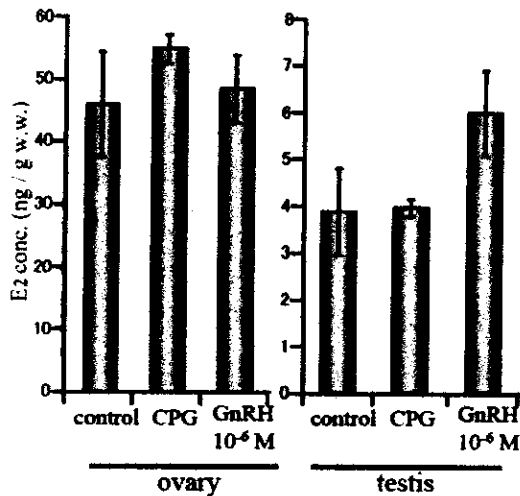


Fig. 26. *In vitro* effect of mGnRH and CPG on estradiol-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>) concentration (ng / g wet weight) in the gonad of scallop *P. yessoensis*. Each value represents the mean  $\pm$  SE (n = 4).

養を行った結果、0.01% DMSO 培地を用いたコントロールと比較し、E<sub>2</sub> 添加実験区では有意に精原細胞増殖率が増加していた (Fig. 21)。

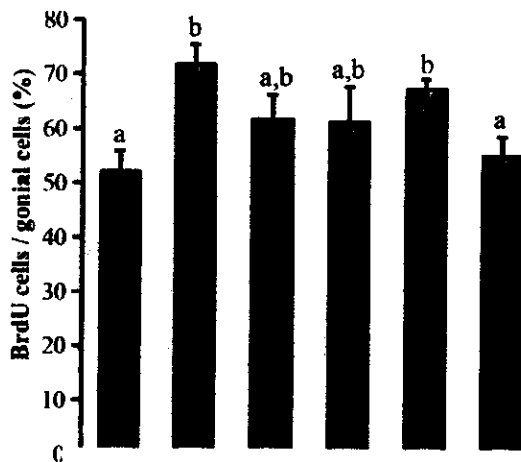


Fig. 22. Inhibitory effect of ICI 182,780 on E<sub>2</sub> and mGnRH-induced spermatogonial proliferation. Each value represents the mean  $\pm$  SE (n=4). Values with different letters are significantly different (p < 0.05).

*in vitro* 精巣組織培養にプロゲステロン、テストステロン、E<sub>2</sub> を添加して培

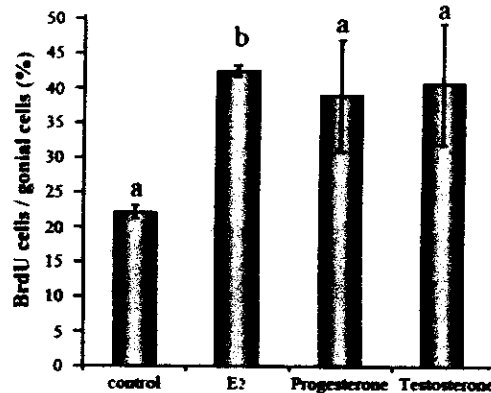


Fig. 21. *In vitro* effect of three types of steroid on spermatogonial proliferation of *P. yessoensis*. Each value represents the mean  $\pm$  SE (n = 3 - 4). Values with different letters are significantly different (p < 0.05).

ステロン、テストステロン添加実験区もコントロールと比較して有意ではないが、精原細胞増殖を促進する傾向が見られた (Fig.21)。

E<sub>2</sub> と mGnRH の添加によって誘導される精原細胞増殖は、ICI 182,780 の存在によってともに有意に阻害された (Fig. 22)。

## 考察

卵巣の E<sub>2</sub> 量は産卵期に向かって上昇する傾向にあるとされているが (Matsumoto et al., 1997)、卵巣では卵黄タンパク形成に増加した E<sub>2</sub> が促進的に働き、精巣では増加した E<sub>2</sub> が精子形成に何らかの役割を担っている可能性が推察

されている (Osada et al., 2004b)。

そこで E<sub>2</sub> がホタテガイの精原細胞増殖に関与するのかを、その前駆体であるプロゲステロンとテストステロンを含む、3 種のステロイドホルモンを精巢の組織培養系に添加して検討した。実際、E<sub>2</sub> は有意に精原細胞増殖を促進した (Fig. 21)。脊椎動物ではステロイドホルモンによって配偶子形成の進行が促進されることがよく知られている。生殖原細胞の増殖に関しては、ニホンウナギで精巢のライディヒ細胞で産生される 11-ケトテストステロンによって精原細胞増殖が引き起こされ (Miura et al., 1991)、ヨーロッパトノサマガエル *R. esculenta* の精巢においては E<sub>2</sub> によって精原細胞数が増加することが報告されている (Minucci et al., 1997)。一方、無脊椎動物ではキヒトデ属の *Asterias vulgaris* において、*in vitro* で精巢をプロゲステロンで前処理し、その後 E<sub>2</sub> で処理すると生殖上皮の有糸分裂活性が増加することが知られている (Marsh and Walker, 1995)。これらのことはホタテガイでも E<sub>2</sub> の精原細胞増殖に対する関与が強く支持し、CPG の GnRH 関連ペプチドが精巢内でエストロゲン合成細胞に作用して、そこで E<sub>2</sub> の合成・放出を促進することによって精原細胞増殖を促進的に調節しているのではないかという仮説が提案される。

一方、E<sub>2</sub> の前駆体であるプロゲステロンやテストステロンも有意ではないが精原細胞増殖活性を示した (Fig. 21)。二枚貝では生殖巣でコレステロールからアンドロゲンまでの生合成や (De longcamp et al., 1974)、17 $\beta$ -HSD、3 $\beta$ -HSD、P450 Arom の活性や免疫学的なエストロゲン合成細胞の同定が報告されている (Matsumoto et al., 1997; Osada et al., 2004b)。このことは精巢組織培養に添加されたプロゲステロンとテストステロンが培養組織で最終的に E<sub>2</sub> に変換され、その結果、あたかも E<sub>2</sub> と同じように精原細胞増殖に促進的に働いているように見えたと考えられた。それは E<sub>2</sub> に比べてプロゲステロンとテストステロンを添加した、精巢組織間の大きな結果のばらつきにも反映されているものと考えられた。

先の仮説、すなわち GnRH 関連ペプチドによる精原細胞増殖が E<sub>2</sub> の生合成を介して行われている可能性を検証した。生殖巣組織培養系に出発物質としてのコレステロールは加えていないので、E<sub>2</sub> 合成に向かうのであれば内因性のプロゲステロンもテストステロンも前駆体として消費され最終産物である E<sub>2</sub> にそれが反映されるはずである。卵巣のステロイドホルモン量に CPG 抽出液も mGnRH もともに影響を及ぼさなかったが、精巢ではプロゲステロン量とテストステロン量がともに減少し、E<sub>2</sub> 量が mGnRH 添加区で増加した (Fig. 24, 25, 26)。精巢

でのプロゲステロンとテストステロンの減少は培養中の拡散によるのではないことは、卵巣でステロイドホルモン量に変化していないことから明らかであり、精巣のプロゲステロン量とテストステロン量がともに減少し、E<sub>2</sub>量がmGnRH添加区で増加したという事実は、拡散によるステロイドホルモンの減少というよりむしろ前駆体としてE<sub>2</sub>に変換されていることを示唆している。哺乳類では精巣でGnRHは基礎ステロイド生合成の促進に直接的に作用すると報告されている (Leung and Steele 1992)。またホヤ類では、カタユウレイボヤ *C. intestinalis* の生殖巣を *in vitro* でGnRH処理をするとステロイドホルモンの合成・放出量が増加し (Di Fiore et al., 1999)、スボヤの一種 *C. productum* の内臓側の血洞にtGnRH-Iを注入すると生殖巣内のE<sub>2</sub>量が増加することが示されている (Craig et al., 1997)。したがって、ホタテガイのGnRH関連ペプチドはE<sub>2</sub>合成を促進することで、ホタテガイの精原細胞増殖に促進的に働いていると考えられた。それを支持するように、E<sub>2</sub>とmGnRHによって誘導された精原細胞増殖がエストロゲンアンタゴニストによって抑制された。すなわち、mGnRHによる精原細胞増殖促進はエストロゲン受容体を介している、言い換えれば、エストロゲン合成促進を介していることに他ならない。

CPG抽出液添加区の精巣ではプロゲステロン量とテストステロン量はともに減少したが、E<sub>2</sub>量はコントロールとほぼ等しかった (Fig. 26)。しかしCPG抽出液には抗mGnRH抗体に反応するGnRH関連ペプチドが存在していることと、CPG抽出液添加実験区では、プロゲステロン量とテストステロン量はmGnRH添加区と同じように減少する傾向を示したので、少なくともE<sub>2</sub>合成まではCPGに存在するGnRH関連ペプチドが促進していることが推測される。さらに、中枢神経であるCPG抽出液にはGnRH関連ペプチド以外の因子も含んでいることは当然考えられるので、培養した精巣においてCPGに含まれていた何らかの因子がE<sub>2</sub>の代謝を促進し、E<sub>2</sub>量を検出するために用いた抗E<sub>2</sub>抗体が結合できない抱合体などに変換された可能性がある。

これらのことをまとめると、ホタテガイのCPGから分泌され血球で運ばれたGnRH様分子が、エストロゲン合成細胞上に存在するであろうGnRH様分子受容機構を介して、E<sub>2</sub>合成を促進し、精原細胞増殖に促進的に働くことで、GnRH様関連ペプチドによるホタテガイの精原細胞増殖の促進は調節されていると考えられた。今後、GnRH関連ペプチドの受容機構を明らかにするためにもホタテガイのGnRH受容体の同定と構造決定が待たれる。

### 3. 中枢神経由来の卵黄形成促進因子 VPF と GnRH

卵に蓄積される卵黄タンパクである Vn の前駆体の Vtg の合成調節に着目し検討した。

これまでにホタテガイ Vtg cDNA がクローニングされ、卵黄タンパクの合成は CPG 由来の VPF と E2 によって促進的に調節され、特に E2 は ER を介した転写レベルで、VPF は翻訳レベルで促進因子として働いているのではないかと考えられている (Osada et al., 2004a)。またこれらの両促進因子は卵黄形成期の卵母細胞にのみに接して存在する auxiliary cell で働いていると考えられた。さらに VPF は熱に対して安定で、トリプシン/キモトリプシンに耐性を持つ分子量 10,000 以下のペプチド様分子であることが推察された (Osada et al., 2003)。さらに、ホタテガイの雌雄の CPG に生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (gonadotropin-releasing hormone ; GnRH) 様神経細胞が存在し、血球を介してエストロゲンの合成を促すことによって精原細胞増殖に促進的に働くことが明らかにされた (中村, 2006, Nakamura et al., 2007)。しかし雌では卵黄形成期にも GnRH 様物質が分泌されていること、さらに GnRH は先の VPF と同様に熱に対して安定なペプチドであることから、GnRH が卵巣で卵黄タンパク合成に関連している可能性が考えられた。

そこで本章では、まず ER と Vtg を指標にして、Vtg タンパク合成を担う auxiliary cell の形態的变化を追跡し、卵黄タンパク形成過程での Vtg 合成細胞の果たす役割を明らかにした。次にホタテガイ Vtg の合成を促進する 2 つの促進因子である VPF と E2 がどのように Vtg 合成の転写と翻訳に関与しているのかを解明し、さらに VPF の候補物質の一つとして GnRH が挙げられたため、GnRH が VPF である可能性について卵巣組織培養系を用いて検討した。

#### \* 卵成長と auxiliary cell の細胞動態

#### 材料と方法

##### 実験材料

auxiliary cell の同定のための ER 様分子と Vtg 分子の確認のための免疫染色には、第 1 章の第 3 節に用いた雄勝湾の St.1 の上層のホタテガイ卵巣を実験に供した。

同定した auxiliary cell の動態観察には女川湾の同一地域で養殖されている二年貝のホタテガイを 10 月から 3 月までの毎月、および 6 月に採取して実験に供した。

##### 固定およびパラフィン切片作成

免疫染色のための生殖巣組織を切り出し、4℃で 24 時間、ブアン氏液で固定した。エタノール脱水後、固定組織をパラフィン包埋し、連続したパラフィン切片 (5μm) を作成し、組織観察に供した。

auxiliary cell の動態観察のためのパラフィン切片作製では、生殖巣組織を切り出し、4℃で 24 時間、4%パラホルムアルデヒド/PBS で固定し、エタノール脱水後、固定組織をパラフィン包埋し、パラフィン切片 (5μm) を作成し、組織

観察に供した。

#### 抗ヒト ER 抗体を用いた卵巣組織切片の免疫染色

パラフィン切片を常法どおり脱パラフィン後、親水化した切片を抗原である ER の賦活化をするため、10 mM クエン酸緩衝液 (pH6.0) 中で 10 分間のマイクロウェーブ照射を行った。そして内因性のペルオキシダーゼの除去のため 3%過酸化水素メタノールに室温で 30 分間浸漬し、流水洗した。次に、10 mM phosphate buffer 150 mM NaCl (PBS) (pH7.2) に 5 分間浸漬した後、1%ゼラチン/PBS により室温で 1 時間ブロッキングをし、PBS で 100 倍希釈した抗ヒト ER 抗体 (YLEM, Italy) を一晩 4℃で反応させた。その後、1%ゼラチン/PBS で 250 倍希釈したビオチン標識ヤギ抗ウサギ IgG (Zymed, USA)、PBS で 250 倍に希釈したストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼ (Zymed, USA) をそれぞれ続けて室温で 1 時間反応させた。この間全ての反応の間には PBS による洗浄を行った。次に 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) に溶解した 0.02% 3,3' ジアミノベンチジン (Sigma, USA) と 0.005%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に切片を 10 分程度浸漬し発色させた。コントロールとしてはウサギ正常血清を 1 次抗体の代わりに用いた。

#### 抗ホタテガイ Vn 抗体を用いた卵巣組織切片の免疫染色

Vtg の抗原性は Vn とほぼ共通していることから (Tsukimura et al., 2002) 抗ホタテガイ Vn 抗体を用いて Vtg 合成細胞としての auxiliary cell の同定を行った。パラフィン切片を常法どおり脱パラフィン後、親水化した切片を PBS に 5 分間浸漬した後、1%ゼラチン/PBS により室温で 1 時間ブロッキングをし、PBS で 100 倍希釈した抗ホタテガイ Vn 抗体 (Osada et al., 1992) を一晩 4℃で反応させた。その後、PBS で 500 倍希釈したビオチン標識ヤギ抗ウサギ IgG (Zymed, USA)、PBS で 250 倍に希釈したストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼ (Zymed, USA) をそれぞれ続けて室温で 1 時間反応させた。この間全ての反応の間には PBS による洗浄を行った。発色反応は、上記の抗ヒト ER 抗体を用いた卵巣組織切片の免疫染色と同様にして行った。コントロールとしてはウサギ正常血清を 1 次抗体の代わりに用いた。

#### ホタテガイの卵巣組織観察

H・E 重染色を施し、エタノール脱水後、カナダバルサムで封入した。切片を光学顕微鏡下で観察し、各月毎の卵巣における単位生殖小胞当たりの卵母細胞数、auxiliary cell 数を 1 個体につき 10 小胞の計測を行った。さらに卵母細胞長軸径および auxiliary cell の直径を 1 個体につき 50 細胞測定した。

#### 結果

Fig. 2-1 は ER 様分子並びにホタテガイ Vn と Vtg の局在を確認するため 12 月上旬の成長期にある卵巣組織を固定し、連続したパラフィン切片で抗ヒト ER 抗体 (B)、抗ホタテガイ Vn 抗体 (D) とコントロールとしてウサギ正常血清 (A, C) を用いた免疫染色と H・E 重染色 (E) を施したものである。その結果、同一の卵母細胞に接して存在する直径が 5μm 前後の auxiliary cell に抗ヒト ER 抗体および抗ホタテガイ Vn 抗体による免疫染色で陽性反応がみられた。抗

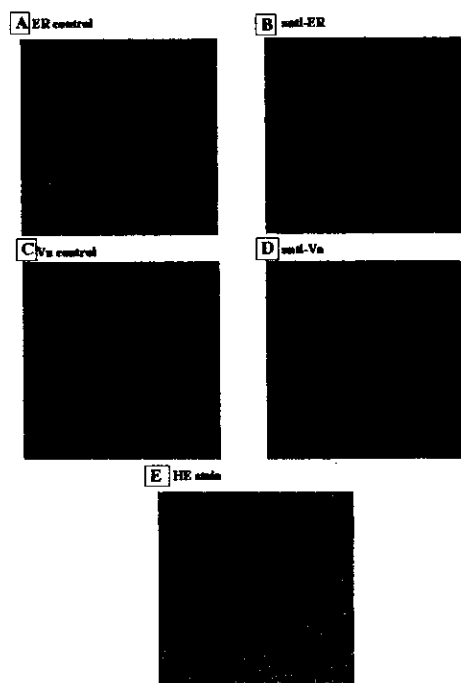


Fig. 2-1 Immunolocalization of ER-like molecule and scallop Vn and Vtg at the "Auxiliary cell (arrowhead)" in the ovary of *P. yessoensis*. Scale bar: 10  $\mu$ m

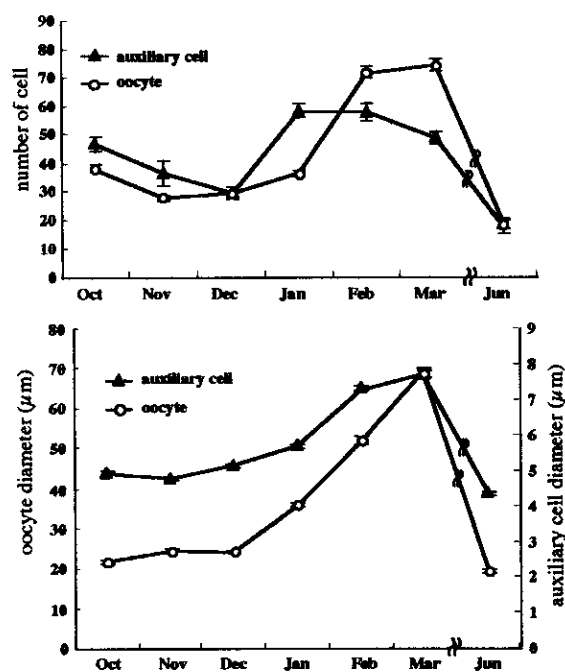


Fig. 2-2 Changes in number of auxiliary cell and its diameter during sexual maturation.

ヒト ER 抗体を用いた免疫染色では auxiliary cell だけでなく卵母細胞の核に、抗ホタテガイ Vn 抗体による免疫染色では卵母細胞の細胞質にも陽性反応を確認した。

抗ヒト ER 抗体および抗ホタテガイ Vn 抗体による免疫染色で同定した auxiliary cell を、H・E 重染色を施した切片上で、季節毎に量的変動を明らかにするため、単位小胞あたりの auxiliary cell の数および卵母細胞の数、そして auxiliary cell の直径および卵母細胞長軸径の計測を行った (Fig. 2-2)。その結果、auxiliary cell の数は 10 月から 12 月までやや減少する傾向がみられた後、12 月から 1 月にかけて急激に増加し、1 月から 2 月までその数を保持した後、2 月から 3 月にかけて緩やかに減少し、産卵後の 6 月には最低値を示した。卵母細胞数は 11 月から 1 月まで緩やかに増加したのち、1 月から 2 月にかけて急激に増加し 3 月までその数はほとんど変わらず、産卵後の 6 月には最低値を示した。

auxiliary cell の直径は 11 月から 3 月まで増加し、特に 1 月から 2 月にかけて顕著な増加がみられ、その後 3 月まではわずかな増加が見られた。卵母細胞長軸径は 10 月から 12 月まではほぼ一定の大きさで、12 月から 3 月まで増加した。

\* Vtg の合成調節における E2 と VPF の役割

## 材料と方法

### 実験材料

ホタテガイは女川湾の同一地域で養殖されている二年貝で、卵巣が成長期にある 2 月上旬のものを実験に供した。

以下の実験方法は Osada et al. (2003, 2004a) に従った。



### *In vitro* 卵巣組織培養

*In vitro* 卵巣組織培養に用いた培地は1Lの75% ASWにMedium 199 (GibcoBRL, USA) を9.8 gとストレプトマイシン (SIGMA, USA) を100 mg溶解させたものを濾過滅菌して作成した。以下のすべての操作は無菌条件下で行った。

まず、ホタテガイ卵巣を切り出し、表面を75%エタノールで拭いて殺菌し、腸管に培地を流し込み洗浄を行った。卵巣は培地中で約5mm角に細切し、培地で2回リンスし、卵黄タンパク量およびVtg mRNAの発現量の解析のため、24穴細胞培養用マルチプレート (Sumitomo Bakelite Co., Ltd., Japan) の中に1ウェルに2片ずつ入れた。1ウェルには添加物を加えて濾過滅菌した培地を1ウェル内に1mlとなるように分注し、10℃で5日間培養を行った。培地の交換は2日目に行い、5日目に卵巣組織を取り上げドライアイスで凍結した後、-80℃で保存したものを各々、ELISA法による卵黄タンパク量およびVtg mRNAの発現量の分析に用いた。

### 培地への添加物

培地に添加するために用いたCPGは12月と1月にホタテガイの雌の個体から切り出し、内臓神経節 (VG; visceral ganglion) は-80℃で保存したものをを用いた。CPGおよびVGに培地を加え、氷冷化でホモジナイズしたものを5分間煮沸した。その後、4℃、22k × gで10分間遠心分離を行い、得られた上清を濾過滅菌してCPG抽出液およびVG抽出液として実験に用いた。

E2はdimethylsulfoxide (DMSO) に溶解させたものを培地で最終濃度が $10^{-6}$ Mとなるよう調整して添加した。またE2添加実験区以外の実験区にはそれぞれ0.01% (E2添加の実験区に含まれているものと同量となる) DMSOを培地に添加した。コントロールは、0.01%DMSO培地を用いた。

mGnRHは培地で最終濃度が $10^{-6}$ Mとなるよう調整し添加した。GnRHの用量依存性の検討には培地で最終濃度が $10^{-6}$ ~ $10^{-10}$ Mとなるように培地で調整したGnRHを実験に用いた。

### 培地への添加方法

1000  $\mu$ lの培地に添加物として1ウェルにつき雌雄それぞれの0.5個体分のCPG抽出物、雌0.5個体分のVG抽出物、最終濃度 $10^{-6}$ Mとなるよう調整したE2、最終濃度が $10^{-6}$ ~ $10^{-10}$ Mになるよう調整したmGnRHを添加した。抗体による吸収実験では、0.5個体分のCPG抽出液に対して5倍に希釈した抗mGnRH抗体 (PROGEN BIOTECHNIK GMBH, Germany) で吸収処理を行い4℃で一晩静置した後、18,000 × g、10分間遠心分離し得られた上清を添加した。

GnRHのアнтаゴニストとの競合実験には1ウェル中の最終濃度が $10^{-6}$ Mとなるように調整したAntide (Sigma, USA) および[D-pGlu<sup>1</sup>, D-Phe<sup>2</sup>, D-Trp<sup>3,6</sup>]GnRH (Sigma, USA)をCPG抽出液 (0.5個体分) とともに添加した。

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法によるホタテガイ卵黄タンパク量の定量

卵巣組織片20 mgを1.0 mlの20 mM Tris-HCl (pH8.0) 2% NaCl (TBS) でホモジナイズしたものを、25k × gで20分間、4℃で遠心した。上清はTBSで256倍希釈し、希釈した上清50  $\mu$ lを一晩、4℃でELISA plate (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) に固相化した。固相化した上清を廃棄し、TBSで洗浄した後、1% BSA

31

添加し、16 時間、50℃の条件でハイブリダイゼーションを行った。0.1% SDS を含む  $2 \times \text{SSC}$  で 10 分間、室温にて洗浄し、さらに 0.1% SDS を含む  $0.2 \times \text{SSC}$  で 55℃にて洗浄した後、DIG 標識したプローブとハイブリダイズしている転写産物の発現量を DIG Nucleic Acid Detection Kit (Boehringer Mannheim) を用いて可視化した。可視化した転写産物は、Densitograph (ATTO, Japan) を用いてメンブランの画像を取り込み、Lane & Spot Analyzer ver. 6.0 (ATTO, Japan) により発現量の解析を行った。データは輝度値として評価した。

## 結果

VPF の組織特異性の検討するため CPG と VG の抽出液を添加し *in vitro* 卵巣組織培養を行い Vn および Vtg 量の計測を行った (Fig. 2-4)。その結果、CPG 抽出液添加区ではコントロールに比べ有意な増加が見られたのに対し、VG 抽出液添加区ではコントロールとほぼ同程度の値を示した。

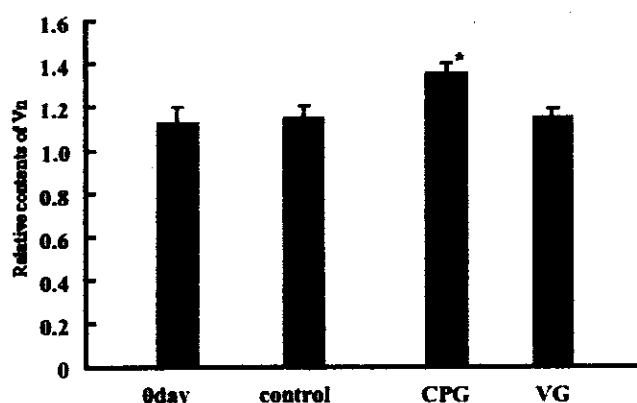


Fig. 2-4 Effect of CPG and VG extract on Vn contents in the ovarian fragment of *P. yessoensis* cultured for 5 days.

\* $P < 0.05$  significantly different from the control.

Each value indicates the mean  $\pm$  SE ( $n=4$ ).

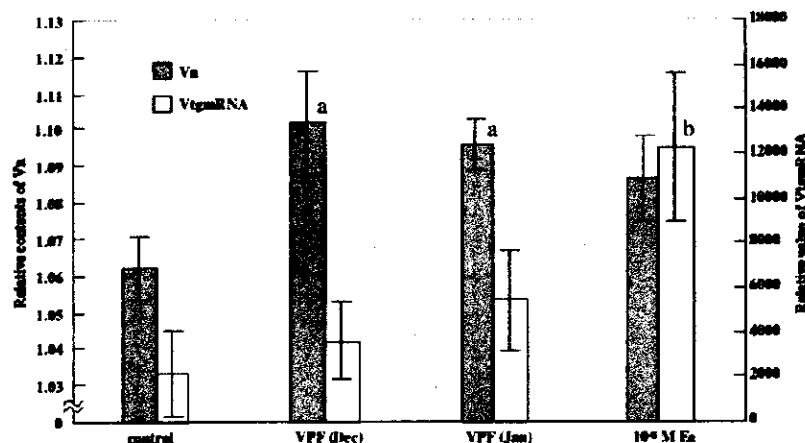


Fig. 2-5 Effect of E2 and VPF (Vitellogenesis Promoting Factor) on Vn and Vtg mRNA contents in the ovarian fragment of *P. yessoensis* cultured for 5 days.

a, b $P < 0.05$  significantly different from the control. Each value indicates the mean  $\pm$  SE ( $n=4$ ).

卵黄タンパク形成の促進因子である VPF と E2 が Vn の前駆体である Vtg の転写、あるいは翻訳のどちらによって卵黄タンパク合成を調節しているのかを明らかにするため、*in vitro* 卵巣組織培養に両促進因子を添加し、転写産物であるホタテガイ Vtg mRNA の発現量および翻訳産物であるホタテガイ Vn と Vtg のタンパク量を測定した (Fig. 2-5)。卵黄タンパク量は 12 月および 1 月に採取した CPG 抽出液を添加した実験区においてコントロールに比べ、有意な増加がみられた。そして E2 を添加した実験区はコントロールに比べ、有意

ではないが増加する傾向はみられた。Vtg mRNA の発現量は 12 月および 1 月に採取した CPG 抽出液を添加した実験区においてはコントロールとほぼ同程度であった。一方、E2 を添加した実験区ではコントロールに比べ、有意に増加した。

卵黄タンパク形成

の促進因子である CPG 由来の VPF の候補物質の一つとして GnRH が挙げられたため、*in vitro* 組織培養実験を行い、翻訳産物である Vn および Vtg 量、また転

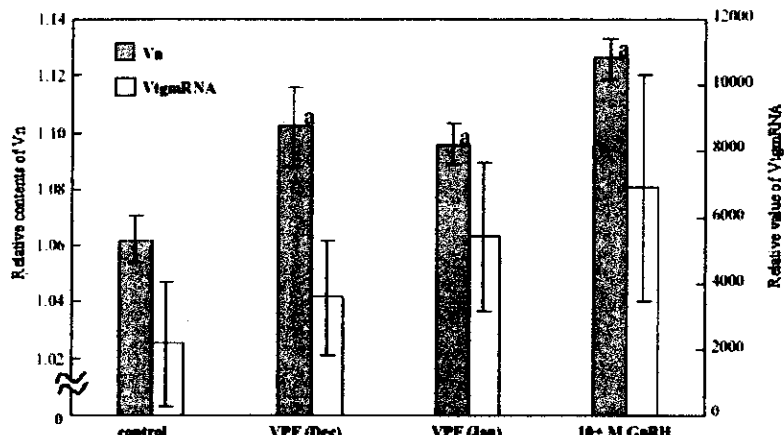


Fig. 2-6 Effect of VPF and GnRH on the Vtg mRNA transcription and translation in the ovarian fragments of *P. yessoensis* cultured for 5 days.

\* $P < 0.05$  significantly different from control. Each value indicates the mean  $\pm$  SE ( $n=4$ ).

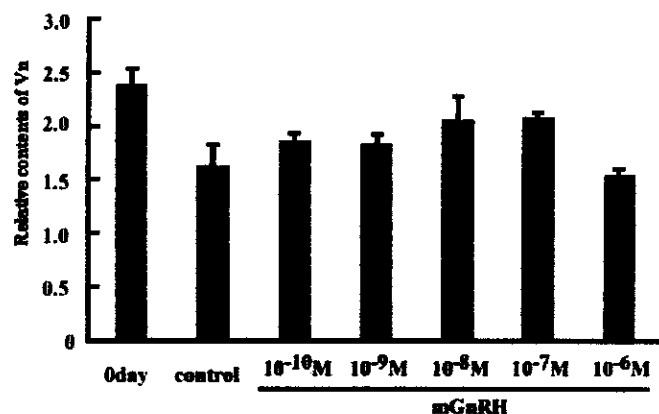


Fig. 2-7 Effect of various concentration of mGnRH on Vn contents in the ovarian fragment of *P. yessoensis* cultured for 5 days. Each value indicates the mean  $\pm$  SE ( $n=4$ ).

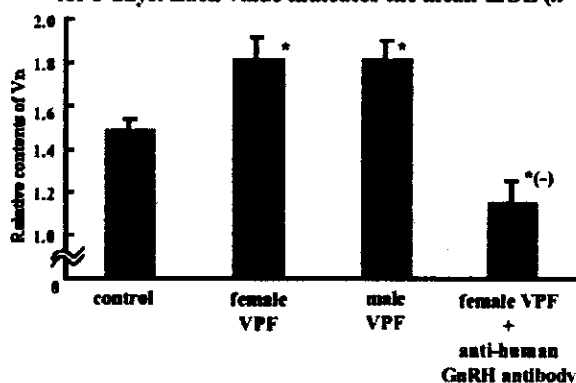


Fig. 2-8 *In vitro* effect of absorption of VPF with anti-mGnRH antibody on Vtg translation in the ovarian fragment of *P. yessoensis* cultured for 5 days.

\*, \*(-) $P < 0.05$  significantly different from control.

Each value indicates the mean  $\pm$  SE ( $n=4$ ).

写産物である Vtg mRNA の発現量がどのように変化するのかを検討した (Fig. 2-6)。その結果、Vn および Vtg 量は 12 月および 1 月に採取した CPG 抽出液を添加した実験区、ならびに mGnRH を添加した実験区において有意にコントロールより増加した。また、Vtg mRNA の発現量は 12 月および 1 月に採取

した CPG 抽出液を添加した実験区、ならびに mGnRH を添加した実験区において、コントロールに比べ有意な増加はみられなかった。しかし、mGnRH 添加区の Vtg mRNA 発現量は VPF 添加区に比べ高い値を示していた。

mGnRH の濃度依存性の検討を行った (Fig. 2-7)。有意ではないが  $10^{-10}$  M から mGnRH 濃度の上昇にともなって Vn 量および Vtg 量は増加し、 $10^{-7}$  M でピークに達した。しかし、それを越える  $10^{-6}$  M では逆に減少した。

雄の CPG 由来の VPF は Vtg 合成を促進するかどうか、そして VPF は抗 mGnRH 抗体が認識する構造をもつかどうかを検討した (Fig. 2-8)。雌雄の CPG 由来の VPF の添加実験区ではともにコントロールに比べ有意に Vn および Vtg 量が増加した。VPF に対し抗 mGnRH 抗体で抗体吸収を行った実験区では、コントロールに比べ有意に Vn および Vtg 量が減少した。

## \*血球および血リンパ上清中のVPFのGnRHとしての同定とタイプ別の検討

### 材料と方法

#### 実験材料

ホタテガイは女川湾の同一地域で養殖されている二年貝で、卵巢が成長期にある12から3月上旬のものを実験に供した。

#### 血球溶解質と血リンパ上清の調整

培地に添加した血リンパ上清と血球は以下のように採取した。2月に雌のホタテガイの心臓から採取した血リンパを、4℃で760×g、10分間遠心分離を行い、沈澱凝集した血球と上清に分けた。血球は数回ASWで洗浄し使用時まで-80℃で保存した。上清は5分間煮沸し、4℃で15,000×g、10分間遠心分離を行った上清を凍結乾燥させ、使用時まで保存した。血球溶解質には保存していた血球に培地を加え、氷冷下でホモジナイズし、4℃で15,000×g、10分間遠心分離を行い、その上清を5分間煮沸し4℃で18,000×g、10分間遠心分離を行い、得られた上清を用いた。凍結乾燥した血リンパ上清は水で再溶解して使用した。

#### In vitro 卵巢組織培養

前節と同様の手順で行った。抗体による吸収実験では、300 μl分の血球および血リンパ上清に対して5倍に希釈した抗mGnRH抗体 (PROGEN BIOTECHNIK GMBH, Germany)、および21倍に希釈した抗sbGnRH抗体で吸収処理を行い4℃で一晩静置した後、18,000×g、10分間遠心分離し得られた上清を添加した。GnRHのアンタゴニストとの競合実験には1ウェル中の最終濃度が $10^{-6}$ Mとなるように調整したAntide (Sigma, USA) および[D-pGlu<sup>1</sup>, D-Phe<sup>2</sup>, D-Trp<sup>3,6</sup>]GnRH (Sigma, USA) を300 μl分の雌の血リンパ上清および血球の抽出液とともに添加した。

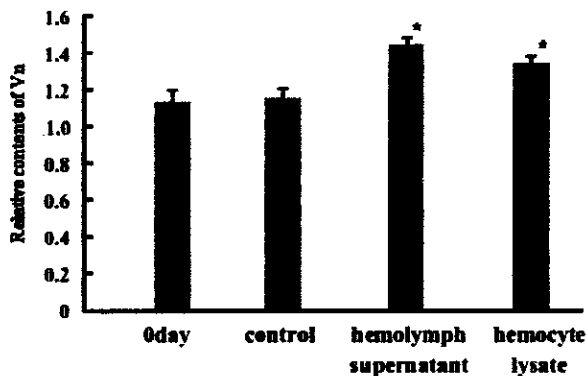


Fig. 2-9 *In vitro* effect of hemolymph supernatant and hemocyte lysate from female on Vtg translation in the ovarian fragment of *P. yessoensis* cultured for 5 days.

\* $P < 0.05$  significantly different from control.

Each value indicates the mean  $\pm$  SE ( $n=4$ ).

### 結果

CPGで産生されたVPFが神経内分泌によりVtg合成を調節するのかどうかを検討するため血球溶解質および血リンパ上清を添加し*in vitro* 卵巢組織培養を用いて検討を行った (Fig. 2-9)。血球溶解質および血リンパ上清添加区ともにコントロールよりもVnおよびVtg量は有意に増加した。特に血リンパ上清添加区では血球に比べてVnおよびVtg量はより高い値となった。

血球に対して抗mGnRH抗体、および抗タイ型GnRH抗体による抗体吸

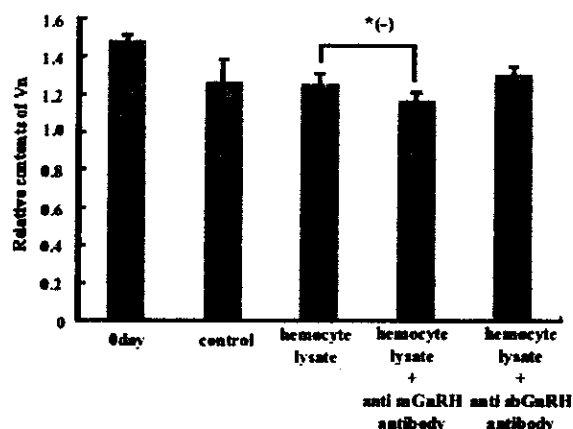


Fig. 2-10 *In vitro* effect of absorption of hemocyte lysate with anti- mGnRH and sbGnRH antibody on Vtg translation in the ovarian fragment of *P.yessoensis* cultured for 5 days.

\*, \*(-)P<0.05 significantly different from control.

Each value indicates the mean  $\pm$  SE (n=4).

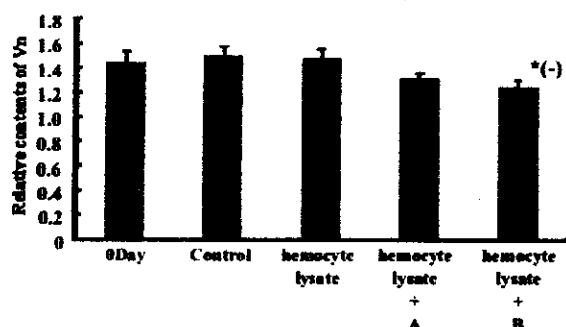


Fig. 2-11 *In vitro* effect of two types of antagonist of mGnRH on hemocyte lysate induced Vtg translation in the ovarian fragment of *P.yessoensis* cultured for 5 days.

\*, \*(-)P<0.05 significantly different from control.

Each value indicates the mean  $\pm$  SE (n=4).

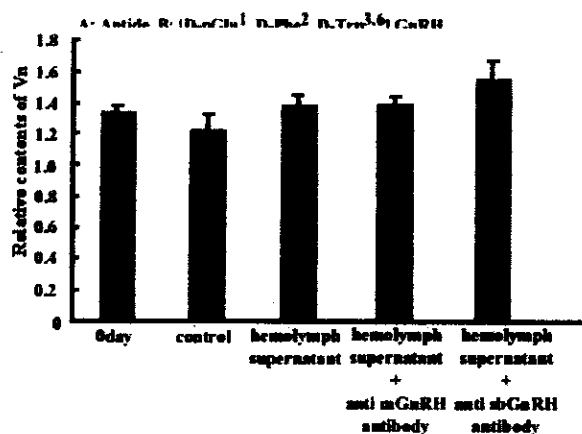


Fig. 2-12 *In vitro* effect of absorption of hemocyte lysate with anti- mGnRH and sbGnRH antibody on Vtg translation in the ovarian fragment of *P.yessoensis* cultured for 5 days.

Each value indicates the mean  $\pm$  SE (n=4).

収を行った (Fig. 2-10)。血球添加実験区のVnおよびVtg量はコントロールと同程度で差はみられなかった。しかし、血球に抗mGnRH抗体を添加した実験区で血球を加えた実験区に対して有意にVnおよびVtg量は低い値となっていた。血球に抗タイ型GnRH抗体を加えた実験区のVnおよびVtg量はコントロールと同程度で差はみられなかった。

次に血球と2種類のmGnRHのアンタゴニストである Antide および [D-pGlu<sup>1</sup>, D-Phe<sup>2</sup>, D-Trp<sup>3,6</sup>] GnRH を添加しGnRHの受容体レベルでの競合を試みた (Fig. 2-11)。その結果、血球添加区のVnおよびVtg量はコントロールと同程度となり、差はみられなかった。しかし2種類のmGnRHアンタゴニストの添加区において、VnおよびVtg量がコントロールおよび血球添加実験区に比べAntide添加区では低い値となる傾向がみられ、特に [D-pGlu<sup>1</sup>, D-Phe<sup>2</sup>, D-Trp<sup>3,6</sup>] GnRH添加区では、有意に低い値を示した。

血リンパ上清でも血球溶解質と同様に抗mGnRH抗体、および抗タイ型GnRH抗体による吸収を行った (Fig. 2-12)。血リンパ上清添加実験区ではコントロールに比べVnおよびVtg量が高くなる傾向がみられた。そして血リンパ上清に対し抗mGnRH抗体、および抗タイ型GnRH抗体による吸収を行った実験区では血リンパ上清添加区と同様程度にVnおよびVtg量は高くなる傾向がみられ、コントロールに比べて低下する傾向はみられなかった。

血リンパ上清においてもmGnRHのアンタゴニスト2種類による競合実験を行った (Fig. 2-13)。その結果、血リンパ上清添加実験区ではコントロールに対し有意な高い値を示した。さらに血リンパ上清に対しアンタゴ

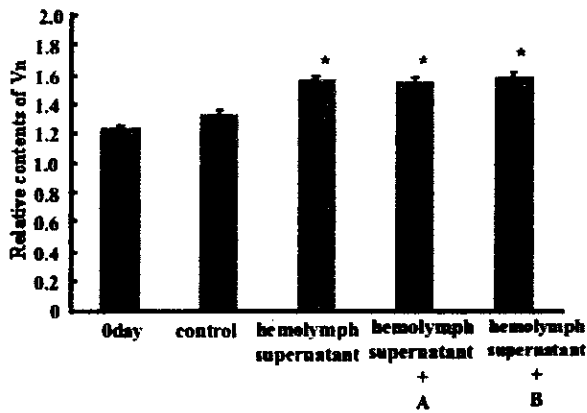


Fig. 2-13 *In vitro* effect of two types of antagonist of mGnRH on hemolymph supernatant induced Vtg translation in the ovarian fragment of *P.yessoensis* cultured for 5 days.

\* $P < 0.05$  significantly different from control.

Each value indicates the mean  $\pm$  SE ( $n=4$ ).

A: Antide; B: [D-pGlu<sup>1</sup>, D-Phe<sup>2</sup>, D-Trp<sup>14</sup>] GnRH

ニスト 2 種類を添加した実験区における Vn および Vtg 量も血リンパ上清添加実験区と同程度にコントロールに比べ有意に高い値となった。

## 考察

抗ヒト ER 抗体および抗ホタテガイ Vn 抗体を用いた免疫染色の陽性反応は同一の卵母細胞に接して存在する auxiliary cell にみられた。Vn は免疫化学的に Vtg と非常に類似しているため (Tsukimura et al., 2002)、抗 Vn 抗体が Vtg も認識することはよく知られている。通常、Vn は卵母細胞に蓄積されたものを意味し、Vn の前駆体として合成さ

れる Vtg と区別する。そのため auxiliary cell にみられた抗ホタテガイ Vn 抗体による免疫染色の陽性反応はホタテガイ Vtg を認識しているものであるといえる。従って、E2 は auxiliary cell において ER を介し Vtg 合成を促進していると推察され、Osada et al. (2003) が示唆した結果を再確認できた。

明らかにされた auxiliary cell の細胞動態を、H・E 重染色を施した切片上で追跡した。ホタテガイの生殖腺発達段階区分 (森ら, 1977) における分化初期から成長期にある 12 月から 1 月にかけての卵巣内で auxiliary cell は急激に増加し、1 月から 2 月までその数を保持した後、成熟期となる 2 月から 3 月にかけて緩やかに減少していった。auxiliary cell の直径は、卵巣が成長期から放出期へと向かう 11 月から 3 月まで増加し続けたが、特に成長期から成熟期へと移行する 1 月から 2 月にかけて顕著に増加がみられた。一般的に、タンパク合成が活発な細胞はタンパク合成を行う細胞小器官であるゴルジ体や小胞体が発達することによりその細胞自体の大きさが増加する。そのため auxiliary cell の直径の増加は Vtg 合成が活発に行われていることを反映したものであると考えられた。したがって、auxiliary cell は卵母細胞の分化初期から成長期にかけてその数を増やし、その後の成長期から放出期へと向かう時期に Vtg の合成能を向上させることにより Vtg 合成を行っていることが推察された。

これまでこの auxiliary cell での Vtg 合成は中枢神経由来の VPF と E2 によって促進的に調節されていると推察された (Osada et al. 2003, 2004a)。さらに *in vitro* 卵巣器官培養において VPF の添加によって Vtg mRNA の発現量に変化がみられなかったことから、E2 は転写レベルで、VPF は翻訳レベルで促進因子として働いているのではないかと考えられた (Osada et al. 2004a)。第 2 節で行った実験から、翻訳産物である卵黄タンパク量は E2 を添加した実験区はコントロールに比べ、有意ではないが増加する傾向はみられ、VPF を添加した実験区においては E2 を添加した実験区よりも増加する傾向がみられ、特にコントロールに比べ有意な増加がみられた。一方、転写産物である Vtg mRNA の発

現量はE2を添加した実験区ではコントロールに比べ、有意に増加する傾向がみられた。しかしVPFを添加した実験区においてはコントロールとほぼ同程度であった。Vtgの抗原性はVnとほぼ共通している(Tsukimura et al., 2002)。そのため抗Vn抗体はVnとVtgを区別せず認識する。第2節で行ったELISA法によるVn量の評価に用いた抗ホタテガイVn抗体はVnとVtg共に認識する。そのため、ELISA法による評価はVnとVtgを含めた評価を行うことになるが、auxiliary cellが卵母細胞に接して存在していることからauxiliary cellで合成されたVtgは直接、卵母細胞へと取り込まれると考えられるため、ELISA法による評価はVtg mRNAからの翻訳産物量の増加を反映していると考えられることができる。これらの結果から、E2はVtg mRNAへの転写を、VPFはVtg mRNAからVtgへの翻訳を促進し、両因子でVtg合成を促進しているということが明らかになった。E2を添加した実験区でコントロールより卵黄タンパク量が増加したのはE2によって促進された転写産物を卵巣中に残存していたVPFが翻訳を促進したことに起因したものであると考えられる。

CPG由来のVPFは熱に対して安定で、トリプシン/キモトリプシンに耐性を持つ分子量10,000以下のペプチド様分子であることが推察された(Osada et al., 2003)。またホタテガイの雌雄のCPGにGnRH様神経細胞を見出し、血球を介して精原細胞増殖に促進的に働くことが明らかにされた(Nakamura, 2007)。しかし雌では卵黄形成期にも分泌されていることから、卵巣では卵黄タンパク合成との関連が推測された。これらのことからVPFの候補物質の一つとしてGnRHが挙げられたため、GnRHがVPFである可能性について卵巣器官培養系を用いて検討した。その結果、GnRHはVPFと同程度の卵黄タンパク合成を促進し、Vtg mRNAへの転写の促進よりむしろ、翻訳を促進することでVtg合成を促進している。すなわちVPFはGnRH様物質である可能性が強く示唆された。一般的に哺乳類では視床下部にあるGnRHニューロンで合成されたGnRHは正中隆起に分布する終末から下垂体門脈に放出され、下垂体の性腺刺激ホルモンすなわち黄体形成ホルモン(luteinizing hormone; LH)および濾胞刺激ホルモン(follicle-stimulating hormone; FSH)の分泌を促進することが知られている。下垂体から血中に放出された性腺刺激ホルモンは性腺である卵巣や精巣に作用し、配偶子形成や性ホルモンの合成・放出を促す(小林・朴, 1998)。ホタテガイには脊椎動物とは異なり下垂体に相当する器官がなく、CPGで産生されたGnRH様物質が直接卵巣へと働きかけ、Vtg合成に作用する可能性があると考えられた。同じ無脊椎動物であるスボヤの一種*Chelyosoma productum*のGnRH神経細胞が血洞の中に入り込み生殖巣や生殖輸管と密接に関係していたことから、下垂体が進化する前の無脊椎動物ではGnRH神経細胞は血流にホルモンを分泌し、生殖巣に直接作用すると推察されている(Powell et al., 1996)。

CPGで産生されたVPFは、血球と血リンパ上清で活性が検出されたことから、神経内分泌によってVtg合成を促進していると考えられた。前述の結果からVPFはGnRHである可能性が示された。通常、同一の物質が異なる伝達経路を介して全く同じ作用をするために標的となる組織に運ばれるという可能性は考えられにくい。実際にホタテガイのGnRHはニワトリⅡ型、サケ型、タイ型のうちタイ型のGnRHに分類され、その主体は中型の神経細胞に局在するが、大型の神経細胞の一部にも局在したことから、GnRHには2タイプ存在する可能性が示された(中村, 2006)。このことからCPGには異なるGnRHが少なくとも2タイプ産生



され、それぞれが血球と血リンパ上清で運ばれ卵巣で作用しているのではないかと可能性が考えられた。

血球中のVPFに対して2種類の抗GnRH抗体吸収を試みた。血球溶解質添加実験区のVtg合成促進活性はコントロールと同程度で差はみられなかったのは卵巣中に内因性の血球によって運ばれているVtg合成促進因子が十分量存在していたためではないかと考えられた。しかし、抗mGnRH抗体によって血球によるVtg合成を低く抑えた。これは抗mGnRH抗体を添加することにより血球に含まれる活性だけでなく卵巣中に含まれている内因性の活性も消失させたためなのではないかと考えられた。一方、抗タイ型GnRH抗体では抗mGnRH抗体のようなVtg合成に対する影響はみられなかった。したがって血球由来のVPFはmGnRH抗体が認識する構造を有しており、mGnRHと類似の構造であることが示唆された。さらに2種類のmGnRHアンタゴニストの添加が血球によるVtg合成活性を内因性の活性もあわせて抑制したことは、血球のVPFは2種類のmGnRHのアンタゴニストと受容体レベルで競合するmGnRHに類似した機能をもつと推察された。すなわち血球で運ばれるVPFはmGnRHの受容体が認識する構造を有している可能性が示唆された。抗GnRH抗体を用いた抗体吸収実験、および2種類のmGnRHアンタゴニストを用いた競合実験の結果から、血球中のVPFはmGnRHのタイプに類似であると考えられた。CPG中の中型の神経細胞が抗mGnRH抗体で認識されるGnRH神経細胞であり(中村, 2006)、血球中のVPFがmGnRHのタイプに類似することから、血球由来のVPFは抗mGnRH抗体で陽性反応の確認された中型の神経細胞で産生されているGnRHである可能性が考えられた。さらに、雄では血球をキャリアとして精巣まで運ばれたGnRHがエストロゲンの合成を促すことで精原細胞増殖を促進することが示された(中村, 2006)。このことは、雌においても血球をキャリアとするGnRHが卵巣中のエストロゲン合成細胞のE2合成を促進しVtg mRNAへの転写を促すことによってVtg合成の促進に関与しているという可能性を意味している。これは前節の卵巣組織培養でVtg mRNAの発現量がmGnRHの添加によって高くなる傾向にあった結果からも示唆される。

血リンパ上清でも血球と同様に2種類の抗GnRH抗体による吸収を行った。しかし、血球の場合と異なり2種類の抗GnRH抗体による吸収は血リンパ上清によるVtg合成促進活性の抑制を示さなかった。したがって血リンパ上清中のVPFは抗mGnRH抗体、および抗タイ型GnRH抗体が認識するGnRHと類似の構造を有していないと考えられた。さらに血リンパ上清中のVPFに対しmGnRHのアンタゴニスト2種類による競合実験によっても、血リンパ上清によるVtg合成活性は抑制されなかった。すなわち、mGnRHの受容体レベルでは競合しなかった。したがって、血リンパ上清で運ばれるVPFはmGnRHの受容体が認識する構造を有していないことが考えられた。これは血球中のVPFがmGnRHのタイプに類似しているのに対し、血リンパ上清中のVPFは「血球中に含まれるGnRHとは異なるタイプのGnRHである可能性」と血リンパ上清は煮沸してもその活性が失活しないことから「GnRHではない別の低分子のペプチド様の促進因子である可能性」の2つの可能性が考えられた。1つ目の可能性である「血リンパ上清中のVPFは血球中に含まれるGnRHとは異なるタイプのGnRHである可能性」については、以下のように説明される。雄のCPG中のGnRH神経細胞には、抗mGnRH抗体と抗タイ型GnRH抗体で共通免疫染色される中型の細胞と、抗タイ型GnRH抗体で免疫染色される一部の大型の神経細胞があり、ホタテガイのGnRHには少

なくとも2タイプのGnRHが存在することが示唆されている(中村, 2006)。血球中のVPFは先に述べたように中型の神経細胞由来のmGnRHに類似することから、血リンパ上清中のVPFはもうひとつのGnRH神経細胞と考えられた大型の神経細胞で産生されているGnRHである可能性が考えられた。2つ目の可能性である「GnRHではない別の低分子のペプチド様の促進因子である可能性」としては、ホタテガイのCPGではGnRH以外にセロトニンやカテコールアミンなどの低分子のモノアミンが分布していることから(森, 1986)、CPG内に含まれるGnRHではないそうした低分子の物質がVPFとして機能する可能性があるとも考えられた。しかしmGnRHによるVtgタンパク合成の強い促進は別タイプのGnRHである可能性を強く示唆する。CPG由来のVPFは転写ではなく翻訳を促進することから、翻訳の促進に主体的に働いているVPFは血リンパ上清由来の因子である可能性が示唆された。

本章の結果からVtg合成は2つの因子であるE2とCPG由来のVPFによって促進的に調節され、E2によってVtg mRNAへの転写、VPFはVtg mRNAの翻訳を促進することでVtg合成の促進をしていることが明らかとなった。そしてCPG由来のVPFの正体はGnRH様物質であり、血球と血リンパ上清をキャリアとする2タイプが存在し、特に血リンパ上清をキャリアとするタイプの因子が主体的にVtgタンパクへの翻訳を促進していることが考えられた。

#### 4. 二枚貝(ホタテガイ・イガイ類)ERについての検討

軟体動物に属する二枚貝においても脊椎動物と同様にステロイドホルモンが存在している。イガイ類のヨーロッパイガイの卵巣と精巣から、GC-MSで内因性のエストロゲンを含むこれらのステロイドが同定された(Reis-Henriques et al., 1990)、同種の卵巣内でコレステロールからアンドロゲンまでの生合成が証明されている(De Longcamp et al., 1974)。マガキとホタテガイで、内因性エストロゲンの同定がなされ、卵巣内で $17\beta$ -HSD、 $3\beta$ -HSD、P450アロマターゼ(P450 Arom)の活性が確認され、卵巣・精巣でエストロゲン合成細胞の特定がなされてきた(Matsumoto et al., 1997; Osada et al., 2004b)。マガキではandrostenedioneからtestosteroneへ、estroneからestradiolへの転移酵素の $17\beta$ -HSDやandrostenedioneからestroneへの転移を起こすアロマターゼ様の活性を持つ分子が存在することが報告された(Le Curieux-Belfond, et al., 2001)。ホタテガイではE2とアロマターゼ活性は生殖周期に伴って変化をすることから、二枚貝の生殖とエストロゲンとの関連が示唆された(Osada et al., 2004b)。これらの報告から二枚貝でステロイドホルモンが生合成され、生殖に関与していると考えられる。

二枚貝でのエストロゲンの作用としてホタテガイでE2が、卵成熟を誘起するセロトニンのシグナルを卵内に伝達する、卵膜セロトニン受容体を誘導することが確認され、(Osada et al., 1998)、それは、エストロゲンによる卵内のセロトニン受容体遺伝子を誘導することによることが明らかにされた(田辺, 2006)。またこれまでの報告からエストロゲンは数種類の二枚貝でビテロジェニンの合成調節を担っていることが確認されている。(Osada et al., 2003, Li et al., 1998)。前章の結果からホタテガイでエストロゲンはVtg mRNAへの転写を促進していると考えられた。同様にマガキでも卵黄タンパク合成を誘導し

ていることが報告されていることから (Li et al., 1998)、エストロゲンは二枚貝の卵形成に密接に関与しているといえる。二枚貝のイガイ類は、環境中の化学物質汚染のリスクを評価するための手法である生物モニタリングである「Mussel Watch」に世界中で用いられている (高田ら, 2004)。内分泌攪乱現象については同じ貝類である腹足類でインボセックスが確認されている (堀口, 2000)。しかし、イガイ類を用いた生物モニタリングシステムである「Mussel Watch」は世界各地で実施されているにも関わらず (高田ら, 2004)、イガイ類の基本的な生殖内分泌の機構に関する十分な知見は得られておらず、イガイ類において生殖内分泌と内分泌攪乱化学物質との関連を議論するには未だ不明な点が多く残されている。

一般的にエストロゲンが作用するにはその受容体である ER を介する。ホタテガイの卵巣において抗ヒト ER 抗体を用いた免疫染色で成長期の卵母細胞とそれに接して存在する濾胞細胞に類した auxiliary cell に陽性反応がみられたことから、卵母細胞と auxiliary cell に ER 様分子が局在していることが示された。つまりホタテガイの生体内においてエストロゲンは ER を介して、卵ではセロトニン受容体遺伝子、auxiliary cell では Vtg 遺伝子の誘導に関与しているのではないかと推察された (Osada et al., 2005)。

他の二枚貝における ER の存在に関しては、淡水産のイガイ *Elliptio complanata* に E2 に特異的に結合するタンパクが存在する (Gagné et al., 2001)。そしてヨーロッパイガイの足部神経節に ERβ 様分子が存在すると報告された (Stefano et al., 2003)。最近では腹足類の巻貝であるイボニシ *Thais clavigera* (Kajiwara et al., 2006)、やアメリカアメフラシ *Aplysia californica* (Thornton et al., 2003) と頭足類のマダコ *Octopus vulgaris* (Keay et al., 2006) の ERcDNA の完全長の配列が決定された。つまり ER は二枚貝を含む広く軟体動物に普遍的に存在し、エストロゲンシグナル伝達によりその生殖内分泌をコントロールしている可能性が推察された。アメリカアメフラシの ER cDNA の配列決定の報告の中で、アメフラシは進化の過程でエストロゲンに対する活性を消失する境界上にある生物なのではないかと推察されている。しかし、前章で得られた結果およびこれまでの二枚貝のステロイドに関する研究報告から、二枚貝ではエストロゲンが生殖内分泌に作用することが示されている。したがって、軟体動物門に属する動物におけるエストロゲンに対する活性の有無については慎重に検討する必要があると考えられた。

そこでここでは二枚貝のエストロゲンシグナル伝達を明らかにするためにホタテガイ ER 関連 cDNA (PyER) の配列決定とその構造解析、組織特異性、そしてステロイドによる発現への影響を検討した。さらに同じ二枚貝に属するイガイ類であるヨーロッパイガイとムラサキイガイの2種にもエストロゲンシグナル伝達の有無を検討するためにホタテガイと同様に検討を行った。

#### \*ホタテガイの ER についての検討

#### 材料, 方法

##### 実験材料

ホタテガイは宮城県女川湾で採集した。PyER の塩基配列の決定には卵黄タン

パク合成期の1月に採取したホタテガイ卵巣を用いた。PyER mRNAの組織特異性の検討には3月下旬に採取した個体から卵巣、精巣、閉殻筋、頭部・足部神経節、内臓神経節、鰓、消化盲囊、外套膜を切り出し、実験に供した。それぞれの組織は実験に使用するまで-80℃で保存した。ステロイドの効果の検討をするための卵巣組織培養には、2月中旬に採取した個体を用いた。

#### 全RNAの抽出とmRNAへの精製

各組織はドライアイス下で粉碎し、ISOGEN（ニッポンジーン, Japan）を用いて全RNAを抽出し、後の各実験に供した。塩基配列の決定には抽出した全RNAをOligotex-dt30<super> Kit（Roche Diagnostics, German）によって精製したmRNAを鋳型として用いた。

#### ホタテガイ ER (PyER) 部分配列のクローニング

既知の脊椎動物および無脊椎動物のERのアミノ酸配列を基に、保存性の高いCドメインおよびEドメインの領域において縮重プライマーを設計した。各プライマーの部位及び配列はFig. 3-2およびTable 3-1に示した。

前述の方法により全RNAから精製したmRNAを鋳型に、PyERのクローニングにはPyER Fw1およびPyER Rv1のプライマーの組み合わせを用いてAccess RT PCR kit（Promega, USA）によりRT-PCRを行った。AMV逆転写酵素及びTflポリメラーゼ存在下でmRNA 100 ngを鋳型に48℃（45 min）の逆転写反応、94℃（2 min）で逆転写酵素の不活化、94℃（30 sec）、54℃（1 min）、68℃（2 min）、40サイクルのPCRを行い68℃（7 min）の伸長反応を行った。このRT-PCRで得られたPCR産物を鋳型にnested PCRとしてPyER Fw2とPyER Rv1を用いてPlatinum Taq DNA Polymerase High Fidelity（Invitrogen, USA）で94℃（2 min）のDNAの熱変性及び酵素の活性化、94℃（30 sec）、49-54℃（1 min）、68℃（2 min）、35サイクルでPCRを行った後、68℃（7 min）の伸長反応を行った。このPCR産物を低融点アガロースゲルの2.5%のNuSieve GTG agar（CAMBREX, USA）で電気泳動により分離し、増幅産物をQIAEXII Agarose Gel Extraction（QIAGEN, USA）を用いてゲルから回収した。次に回収した増幅産物をpGEM T-easy vector System（Promega, USA）を用いてライゲーションを行いサブクローニングした。そして目的の断片を含んだ大腸菌のコロニーを選択しアンピシリン濃度が50 µl/mlとなる液体LB培地で培養し、QIAprep® Spin Miniprep Kit（QIAGEN, USA）を用いプラスミドDNAの回収した後、シーケンサーのDSQ2000（SHIMADZU, Japan）を用いてDye Primer法でシーケンスした。コンセンサスの得られたcDNA配列をアミノ酸配列に演繹したものをBLAST（Basic Local Alignment Search Tool）により相同性の検索を行った。ER部分配列の構造解析にはPSORT IIとInter Pro Scanを用いて行った。分子系統樹解析には近隣結合法によりブーツストラップ値は1000回で行い、描いた分子系統樹は%表記によって作成した。

#### 卵巣組織培養の方法

卵巣組織培養は前章の方法に従い、培養期間を2日間にして行った。In vitro卵巣組織培養に用いた培地は1Lの75% ASWにMedium 199（GibcoBRL, USA）を9.8 gとストレプトマイシン（SIGMA, USA）を100 mg溶解させたものを濾過滅菌して作成した。以下のすべての操作は無菌条件下で行った。

まず、ホタテガイは卵巣を切り出し、表面を75%エタノールで拭いて殺菌し、腸管に培地を流し込み洗浄を行った。培地中でそれぞれの卵巣を約5mm角に細切し、培地で2回リンスし、24穴細胞培養用マルチプレート (Sumitomo Bakelite Co., Ltd., Japan) の中に1ウェルに1片ずつ入れた。1ウェルには添加物を加えて濾過滅菌した培地を1ウェル内に1mlとなるように分注し、10℃で2日間培養を行った。2日後に卵巣を取り上げ-80℃で保存し、ホタテガイ卵巣はVtg mRNAおよびPyER mRNAの発現量の解析に供した。

#### 培地への添加物

ホタテガイ卵巣組織培養はE2をdimethylsulfoxide (DMSO) に溶解させたものを培地で最終濃度が $10^{-6}$ Mもしくは $10^{-7}$ Mになるように調整して添加した。

E2のアンタゴニストとしてICI 182,780 (TOCRIS, UK) は他のステロイドと同様にDMSOに溶解させ、培地で最終濃度が $25 \times 10^{-6}$ Mとなるように調整し添加した。コントロールには、他のステロイド添加実験区でステロイドの溶解に要したDMSOと同濃度となる0.05% DMSO培地を用いた。各実験区とも4ウェルとなるように行い、各ウェルには1片の卵巣片を入れ2日間培養を行った。卵巣片からISOGEN (ニッポンジーン, Japan) により全RNAを抽出し半定量的RT-PCRによるmRNA発現量解析を行った。

#### 半定量 RT-PCR

各組織のRNAは前述の方法によって得た。ホタテガイVtg (Vtg) の発現量の解析には、Osada et al. (2004) でホタテガイVtg (AB055960) でクローニングに用いられたプライマーSP1とASP1の組合せを用いた。PyERの解析には前述の方法から決定したPyERの部分塩基配列を基にDドメインを挟むように設計したPyER RT-FwとPyER RT-Rvを用いた。ホタテガイアクチンActin (AB 209936) の部分配列を基に2本のプライマーPy/Act-RT-FwとPy/Act-RT-RvをコントロールPCRに

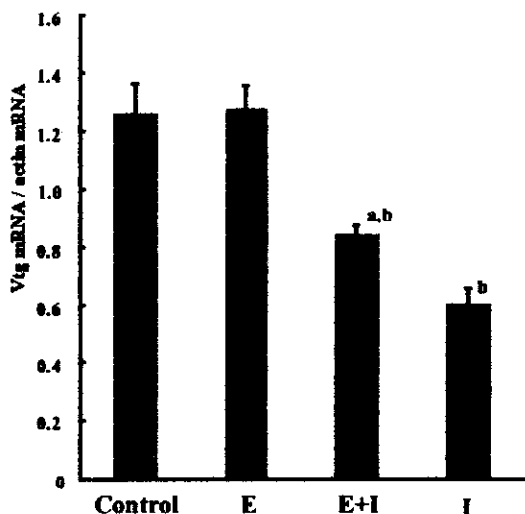


Fig. 3-1 *In vitro* effects of E<sub>2</sub> and E<sub>2</sub> antagonist on Vtg transcription in the ovarian fragment of *P. yessoensis* cultured for 2 days.

E; estradiol-17 $\beta$ , I; ICI 182,780

a,b p < 0.05 significantly different from control.

Each value indicates the mean  $\pm$  SE (n=4).

用いた。各プライマーの配列はTable 3-1に記した。各組織全RNAを鋳型にAccess RT PCR kit (Promega, USA) によりRT-PCRを行った。反応液量は最終液量が25  $\mu$ lとなるように調整し、AMV逆転写酵素及びTfIポリメラーゼ存在下で全RNA 100 ngを鋳型としてRT-PCRを行った。Vtgについては48℃(45 min)で逆転写反応, 94℃(2 min)で逆転写酵素の不活化, 94℃(30 sec), 55℃(30 sec), 68℃(30 sec) 20サイクルでPCRの後68℃(7 min)の伸長反応を行った。PyERについては48℃(45 min)で逆転写反応, 94℃(2 min)で逆転写酵素の不活化, 94℃(30 sec), 60℃(30 sec), 68℃(30 sec) 30サイクルでPCRの後68℃(7 min)の伸長反応を行った。Actinについては48℃(45 min)で逆転写反応, 94℃(2 min)で逆転写酵素の不活化, 94℃(30

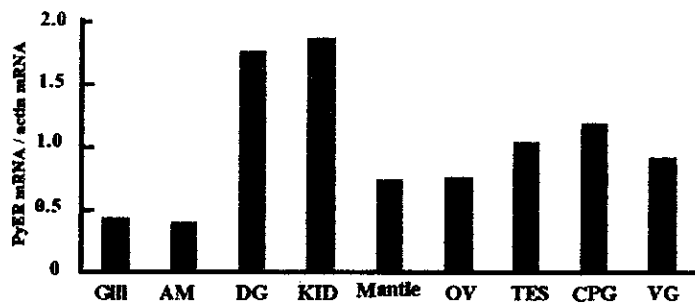


Fig. 3-5 RT-PCR for the PyER transcript in various organs of *P. yessoensis*. PyER was normalized with actin (Pyactin; AB209936). GH: gill, AM: adductor muscle, DG: digestive gland, Kid: kidney, OV: ovary, Tes: testis, CPG: cerebral and pedal ganglion, VG: visceral ganglion.

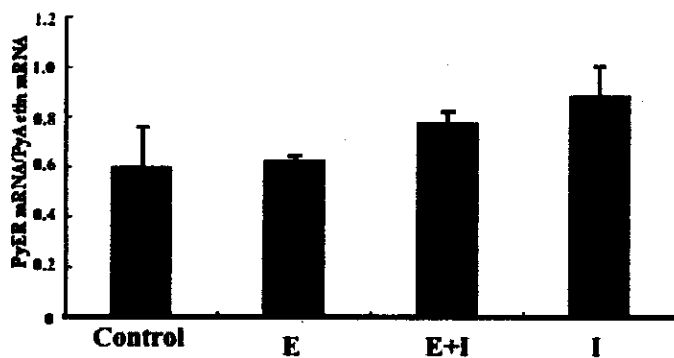


Fig. 3-6. *In vitro* effect E<sub>2</sub> and antagonist of E<sub>2</sub> on PyER transcription in the ovarian fragment of *P. yessoensis* cultured for 2 days.

E; estradiol-17 $\beta$ , I; ICI 182,780

Each value indicates the mean  $\pm$  SE (n=4).

PyER は 143 アミノ酸残基をコードする 430 bp の断片であった (Fig. 3-3)。PyER はこの領域ではアメリカアメフラシの ER である *Aplysia*ER と 66%、*Octopus*ER 62%、*chicken*ER と 54% の相同性を有していた。演繹アミノ酸配列についてモチーフ解析を行った結果、脊椎動物 ER

の C ドメインと E ドメインを部分的に含んでいると推定された。C ドメインの C4 タイプの Zn フィンガーの 1 つ目のドメインの後半に P-BOX 様の構造が、2 つ目のドメインに核移行シグナルが推定された。

分子系統樹解析から ER は 3 つの大きなグループを形成した (Fig. 3-4)。PyER は脊椎動物の ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 、ER $\gamma$  を含むグループとは異なり、原始的であるとされる ERR のグループに属した。特

に PyER は同門である軟体動物門のイボニシ ER やアメリカアメフラシ ER、マダコ ER と同じグループに属した。

PyER は全組織で発現し卵巣や精巣、そして CPG で発現がみられ、腎臓や消化盲嚢で比較的強く発現していた (Fig. 3-5)。

卵巣組織培養を行い、E<sub>2</sub> および E<sub>2</sub> のアンタゴニストを添加し PyER の mRNA 発現量を比較した (Fig. 3-6)。PyER は E<sub>2</sub> 添加実験区ではコントロールとほぼ同程度であったが、E<sub>2</sub> とアンタゴニストを競合させた実験区、そしてアンタゴニストのみを添加した実験区では増加する傾向がみられた。

## \*イガイ類の ER についての検討

### 材料, 方法

#### 実験材料

MeER および Actin の塩基配列の決定には 3 月上旬にカナダの Prince Edward Island で採取したヨーロッパイガイの卵巣および足部神経節を用いた。MeER1 mRNA および MeER2 mRNA の組織特異性の検討には 9 月中旬に採取した個体から卵巣、精巣、閉殻筋、足部神経節、内臓神経節、鰓、消化盲嚢、外套膜を切り出し、実験に供した。各組織は実験に使用するまで -80 °C で保存した。ステロ

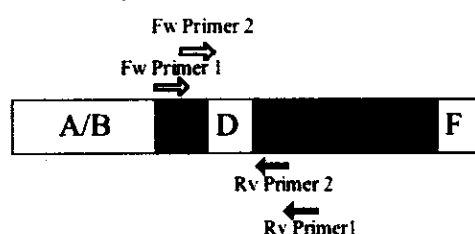
イドの効果の検討をするための *in vitro* 卵巣組織培養には、カナダの Nova Scotia 州の Halifax で4月下旬に採集された個体を用いて行った。

ムラサキイガイは宮城県女川湾で採集した。MgER の塩基配列の決定には2月に採取したムラサキイガイの卵巣を用いた。MgER の組織特異性の検討には11月下旬に採集した個体から卵巣、精巣、閉殻筋、足部神経節、鰓、消化盲囊、腎臓を切り出し、実験に供した。ステロイドの効果の検討をするための *in vitro* 卵巣組織培養は、12月中旬に採取した個体を用いて実験を行った。

#### ヨーロッパイガイとムラサキイガイのPCRによる種判別

ヨーロッパイガイとムラサキイガイでは足糸タンパクの領域でムラサキイガイはヨーロッパイガイと比べて18アミノ酸残基分の欠損があり、その部分を挟むように設計されたプライマーでゲノムDNAのPCRを行うとヨーロッパイガイは180 bp、ムラサキイガイは126 bpの断片を形成することが報告されている(Inoue et al. 1995)。そこでInoue et al. (1995)の方法を改変してPCRによるヨーロッパイガイとムラサキイガイの種判別を行った。増幅用のプライマーはInoue et al. (1995)の用いたMe 15, 5' -CCA GTA TAC AAA CCT GTG AAG A -3' とMe 16, 5' - TGT TGT CTT AAT AGG TTT GTA AGA -3' の組合せを用いた。ゲノムDNAはMeERおよびMgERのクローニングに用いた卵巣からそれぞれphenol-chloroform法を用いて抽出した。抽出したDNA (100 ng)を鋳型として0.5  $\mu$ lのTakara Taq<sup>TM</sup> (5 units/ $\mu$ l) (TAKARA, Japan)を用いて反応液が100  $\mu$ lになるように混合、調整した。次に94  $^{\circ}$ C (5 min) のDNAの熱変性及び酵素の活性化, 94  $^{\circ}$ C (30 sec), 48.7  $^{\circ}$ C (30 sec), 70  $^{\circ}$ C (1 min 30sec), 35 サイクルでPCRを行った。

#### (A). For PyER



#### (B). For MeERs and MgER

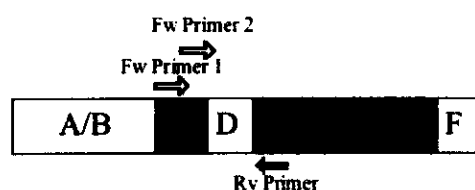


Fig. 3-2 Positions of degenerate primer used on (A)PyER and (B) MeERs and MgER cloning. Gray boxes mean C domain (DNA-binding domain) and E domain (ligand-binding domain).

#### 全 RNA の抽出と mRNA への精製

全 RNA は各組織をドライアイス下で粉砕し、ISOGEN (ニッポンジーン, Japan)を用いて抽出し、後の各実験に供した。ただし MeER1、MeER2 および Actin の塩基配列決定に用いたヨーロッパイガイの卵巣および足部神経節組織からの RNA の抽出には TRIZOL<sup>®</sup> Reagent (GibcoBRL, USA)を用いて抽出を行い、Poly (A) Pure (Ambion Inc, USA) および Poly A Tract mRNA Isolation System (Promega, USA) により全 RNA を mRNA へと精製し部分配列のクローニングに用いた。

#### MeER1, 2 および MgER, MeActin の部分配列のクローニング

前節と同様にプライマーは既知の ER および  $\beta$ -actin のアミノ酸配列を基に、保存性の高い領域において設計した。各プライマーの部位及び配列はFig. 3-2に示した。

前述の方法により全 RNA から精製した mRNA を鋳型に MeER1, 2 および MgER のクローニングには MeER Fw1 および MeER Rv1、のプライマーの組み合わせにより Access RT-PCR kit (Promega, USA) により RT-PCR を行った。AMV 逆転写酵素及び *Tfl* ポリメラーゼ存在下で mRNA 100 ng を鋳型に 48 °C (45 min) の逆転写反応, 94 °C (2 min) で逆転写酵素の不活化, 94 °C (30 sec), 47 °C (1 min), 68 °C (2 min), 40 サイクルの PCR を行い 68 °C (7 min) の伸長反応を行った。RT-PCR で得られた PCR 産物を鋳型に nested PCR として MeER Fw2 と MeER Rv1 を用いて *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen, USA) で 94 °C (2 min) の DNA の熱変性及び酵素の活性化, 94 °C (30 sec), 48 °C (1 min), 68 °C (2 min), 35 サイクルで PCR を行った後、68 °C (7 min) の伸長反応を行った。

Actin のクローニングには前述の方法で精製した mRNA (100ng) に 1 µl の Oligo (dT) Primer (Promega, USA) を加えて、反応液量を 11 µl となるように調整し、RNA の高次構造を破壊するために 70°C、10 分間の反応を行った。その後、4 µl の 5×First Strand Buffer (Invitrogen, USA)、2 µl の 0.1 M DTT (Invitrogen, USA)、1 µl の RNase inhibitor (40 unit/µl) (Promega, USA)、1 µl の dNTP (100 mM each) (CLONTECH, USA) を混合したものを反応液に添加し、42 °C で 2 分間反応させ、1 µl の SuperScript II RNaseH Transcriptase (200 unit/µl) (Invitrogen, USA) を添加し、42°C で 50 分間インキュベートして逆転写反応を行った。その後、70°C で 15 分間反応させ cDNA 合成反応を停止させた。合成した cDNA を鋳型として、Actin Fw および Actin Rv の 2 本のプライマーの組合せを用いて *Taq DNA Polymerase* (Promega, USA) で 94 °C (5 min) の DNA の熱変性及び酵素の活性化, 94 °C (30 sec), 47 °C (1 min), 68 °C (2 min), 40 サイクルで PCR を行った後、68 °C (7 min) の伸長反応を行った。

MeER および Actin のそれぞれの PCR 産物を 2% アガロースゲルで電気泳動により分離し、Agarose Gel DNA Extraction Kit (Roche Diagnostics, Germany) を用いて増幅産物をアガロースゲルから回収した。回収した増幅産物を pGEM T-easy vector System (Promega, USA) にライゲーションしサブクローニングした。目的の断片を含む大腸菌のコロニーをアンピシリン濃度が 50 µl/ml となる液体 LB 培地で培養し、Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, USA) を用いてプラスミド DNA の回収を行い、得られたサンプルを MacroGen (韓国) にシーケンスを外注し ABI 3730×1 DNA アナライザー (Applied Biosystems, USA) を用いて Dye Terminator 法で塩基配列の決定をした。

MgER は前節の PyER と同様に Nested PCR で得られた PCR 産物を低融点アガロースゲルの 2.5% の Nu Sieve GTG agar (CAMBREX, USA) で電気泳動により分離し、増幅産物を QIAEXII Agarose Gel Extraction (QIAGEN, USA) を用いてゲルから回収した。次に回収した増幅産物を pGEM T-easy vector System (Promega, USA) を用いてライゲーションを行いサブクローニングした。そして目的の断片を含んだ大腸菌のコロニーを選択しアンピシリン濃度が 50 µl/ml となる液体 LB 培地で培養し、QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN, USA) を用いプラスミド DNA の回収した後、シーケンサーの DSQ2000 (SHIMADZU, Japan) を用いて Dye primer 法でシーケンスした。前節の PyER と同様にコンセンサスの得られた cDNA



配列をアミノ酸配列に演繹し、BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) により相同性の検索を行った。ER部分配列の構造解析にはPSORT II と Inter Pro Scan を用いて行った。

#### 卵巣組織培養の方法

卵巣組織培養は前節のホタテガイの卵巣組織培養の方法に従い、培養期間を2日間にして行った。*In vitro* 卵巣組織培養に用いた培地は1Lの75% ASWにMedium 199 (GibcoBRL, USA) を9.8 gとストレプトマイシン (SIGMA, USA) を100 mg溶解させたものを濾過滅菌して作成した。以下のすべての操作は無菌条件下で行った。

ヨーロッパイガイおよびムラサキイガイの卵巣は外套膜内部に沿って発達しているため、切り出した外套膜から縁辺部を切り離し、表面を75%エタノールで拭いて殺菌した。培地中で卵巣を約5mm角に細切し、培地で2回リンスし、24穴細胞培養用マルチプレート (Sumitomo Bakelite Co., Ltd., Japan) の中に1ウェルに1片ずつ入れた。1ウェルには添加物を加えて濾過滅菌した培地を1ウェル内に1mlとなるように分注し、10℃で2日間培養を行った。2日後に卵巣を取り上げ-80℃で保存しヨーロッパイガイ卵巣はMeER1 mRNA およびMeER2 mRNAの発現量、そしてムラサキイガイ卵巣はMgER mRNAの発現量の解析に供した。

#### 培地への添加物

培地への添加物も基本的には前節のホタテガイの卵巣組織培養の方法に従って行った。

ヨーロッパイガイおよびムラサキイガイ卵巣組織培養は、ステロイドホルモンとしてE2およびテストステロンはdimethylsulfoxide (DMSO) に溶解させたものを培地で最終濃度が $10^{-6}$ Mとなるよう調整して添加した。

ムラサキイガイ卵巣組織培養では、E2のアンタゴニストとしてICI 182,780 (TOCRIS, UK) は他のステロイドと同様にDMSOに溶解させ培地で最終濃度が $25 \times 10^{-6}$ Mとなるように調整し添加した。コントロールには、他のステロイド添加実験区でステロイドの溶解に要したDMSOと同濃度の0.05%となるDMSO培地を用いた。各実験区とも4ウェルとなるように行い、各ウェルには1片の卵巣片を入れ培養を行った。2日間培養後、卵巣片を取り上げ、ISOGEN (ニッポンジーン, Japan) もしくはTRIZOL Reagent (GibcoBRL, USA) により全RNAを抽出し半定量的RT-PCRによるmRNA発現量解析を行った。

#### 半定量 RT-PCR

各組織のRNAは前述の方法によって得た。半定量RT-PCRは前節の方法に従って行った。MeER1、MeER2 およびMgERの発現量の解析には前述の方法から決定した各ERの部分塩基配列を基にDドメインを挟むようにプライマーを設計した。MeER1 mRNAの発現量の解析にはMeER1 RT-FwとMeER1 RT-Rv、MeER2 およびMgER mRNAの発現量の解析にはMeER2 RT-FwとMeER2 RT-Rvのプライマーの組合せを用いて行った。Actin (AB257134)の部分配列を基に2本のプライマーMeActin RT-FwとMeActin RT-Rvのプライマーを設計し、コントロールPCRに用いた。設計したMeActin RT-FwとMeActin RT-Rvのプライマーの塩基配列はこれまで

に報告されているムラサキイガイの B-actin の完全長の塩基配列 (AF157491) から MgER の半定量 RT-PCR のコントロール PCR として使用可能であることを確認した。各プライマーの配列は Table 3-1 に記した。各組織全 RNA を鋳型に Access RT PCR kit (Promega, USA) により RT-PCR を行った。反応液量は最終液量が 25  $\mu$ l となるように調整し、AMV 逆転写酵素及び *Tfi* ポリメラーゼ存在下で AMV 逆転写酵素及び *Tfi* ポリメラーゼ存在下で全 RNA 100 ng を鋳型とした。RT-PCR は 45  $^{\circ}$ C (45 min) で逆転写反応, 94  $^{\circ}$ C (2 min) で逆転写酵素の不活化, 94  $^{\circ}$ C (30 sec), 50  $^{\circ}$ C (30 sec), 68  $^{\circ}$ C (30 sec) を MeER1, MeER2 については 30 サイクル、MeActin については 20 サイクルで PCR を行った。MgER については 45  $^{\circ}$ C (45 min) で逆転写反応, 94  $^{\circ}$ C (2 min) で逆転写酵素の不活化, 94  $^{\circ}$ C (30 sec), 57  $^{\circ}$ C (30 sec), 68  $^{\circ}$ C (30 sec) で組織特異性の検討には 30 サイクル、ステロイド添加による卵巣組織培養の検討実験には 25 サイクル、MgActin では 20 サイクルで PCR を行った。

アガロースゲルの 2.5% の Metaphor<sup>®</sup> agarose (BioWhittaker Molecular Applications, USA) を用いて、TBE バッファーで電気泳動し、EtBr で染色した後、解析に用いた。PCR によって増幅されるバンドは、MeER1 は 571 bp、MeER2 および MgER は 240 bp、Me Actin は 135 bp、Mg Actin は 134 bp である。

発現量の比較は、発現量を定量化するためにヨーロッパイガイの Actin もしくはムラサキイガイの Actin の増幅バンドの輝度を基準にして「MeER1 もしくは MeER2 を増幅したバンドの輝度 / Actin」、「MgER を増幅したバンドの輝度 / Actin」で数値化し、実験区ごとの平均値を比較した。

## 結果

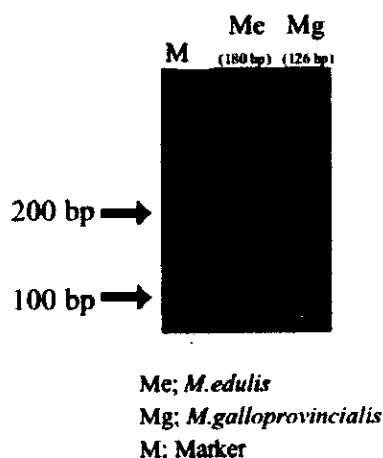
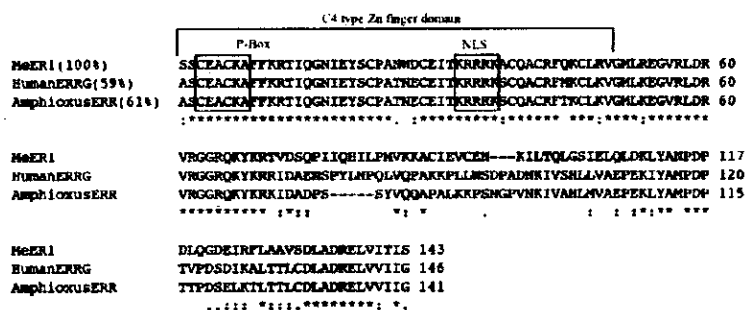


Fig. 3-8 Amplification of the region of adhesive protein gene of mussels.

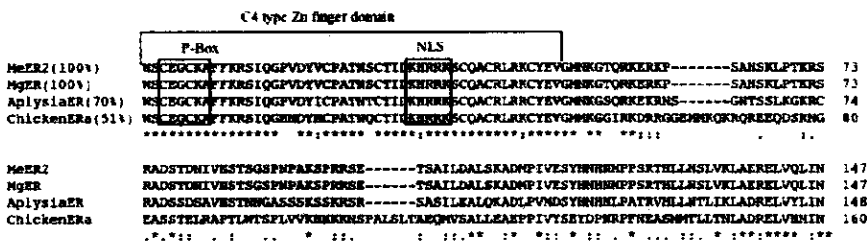
足糸タンパクのゲノム PCR によるヨーロッパイガイとムラサキイガイの種判別を行った (Fig. 3-8)。その結果、ヨーロッパイガイとムラサキイガイではサイズの異なる増幅断片が得られた。ヨーロッパイガイを鋳型として PCR を行ったものでは 180 bp 付近、ムラサキイガイを鋳型にしたものでは 130 bp 付近に増幅断片が得られた。

ヨーロッパイガイとムラサキイガイから得られた ER 様の増幅断片の演繹アミノ酸配列の相同性検索とモチーフ解析、分子系統樹解析を行った。

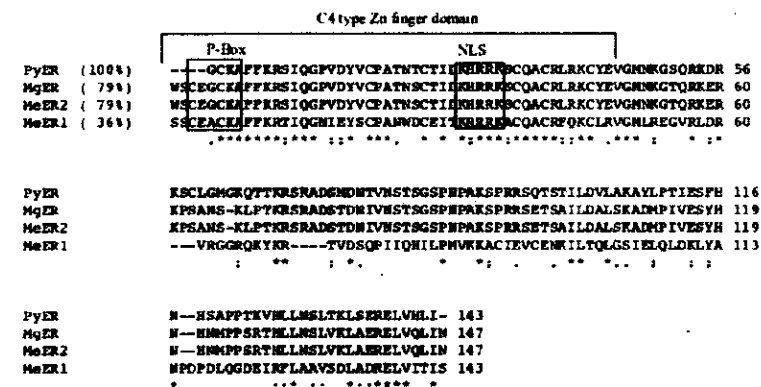
MeER1 は 143 アミノ酸残基をコードする 430 bp の断片であった。MeER1 はこの領域ではヒトの Estrogen Related Receptor Gamma protein と 59%、ナメクジウオの estrogen receptor-related receptor short isoform protein と 61% の相同性を有していた (Fig. 3-9)。MeER1 の演繹アミノ酸配列を用いたモチーフ解析から、MeER1 は脊椎動物 ER の C ドメインと E ドメインを部分的に含んでいると推定された。C ドメインの C4 タイプの Zn フィンガーの 1 つ目のド



**Fig. 3-9 Alignment of MeER1 with other ERs and motif analysis**  
Protein sequences obtained from Genbank were aligned using ClustalX 1.83 with default parameters. Accession No of ERs: HumanERRG (P62506), amphioxusERR (U55709). Percentages in parenthesis indicate the protein sequence identity of MeER1 to others. C4 type Zn finger domain, P-Box and Nuclear Localizing Signal (NLS) were predicted using PSORT II and Inter Pro Scan, which are important residues for DNA binding domain. MeER1 has the high identity to HumanERRG in protein sequence.



**Fig. 3-10 Alignment of MeER2 and MgER with other ERs and motif analysis.**  
Protein sequences obtained from Genbank were aligned using ClustalX 1.83 with default parameters. Accession No of ERs: Aplysia ER (Q6VU64), Chicken ERα (P06212). Percentages in parenthesis indicate the protein sequence identity of PyER to others. C4 type Zn finger domain, P-Box and Nuclear Localizing Signal (NLS) were predicted using PSORT II and Inter Pro Scan, which are important residues for DNA binding domain. MeER2 and MgER has the identical protein sequence and they has the higher identity to Aplysia and Chicken ERs in protein sequence.



**Fig. 3-11 Alignment of PyER with MgER and MeERs.**  
Protein sequences were aligned using ClustalX 1.83 with default parameters. Accession No of ERs: MgER (AB257135), MeER1 (AB257132), MeER2 (AB257133). Percentages in parenthesis indicate the protein sequence identity of MgER and MeERs. C4 type Zn finger domain, P-Box and Nuclear Localizing Signal (NLS) were predicted using PSORT II and Inter Pro Scan, which are important residues for DNA binding domain. PyER has the higher identical protein sequence to MgER and MeER2, but a extremely lower identity to MeER1.

に C4 タイプの Zn フィンガー構造を有し、C ドメインの C4 タイプの Zn フィンガーの 1 つ目のドメインの後半に P-BOX 様の構造が、2 つ目のドメインに核移行シグナルが推定された。

前節で得られた PyER と MeER1、MeER2、MgER の演繹アミノ酸配列での相同性を比較した (Fig. 3-11)。MeER2 と MgER は PyER と 79% の相同性を示したのに

メインの後半に P-BOX 様の構造が、2 つ目のドメインに核移行シグナルが推定された。

MeER2 は 147 アミノ酸残基をコードする 442 bp の cDNA 断片であった (Fig. 3-10)。またムラサキイガイの卵巣から

得られた MgER の演繹アミノ酸配列は MeER2 と一致し、塩基のレベルでも同一であった。MeER2 はこの領域ではアメリカア

Aplysia californica

ER protein と 70%、chickenER α と 51% の相同性を有していた。MeER2 と MgER の演繹アミノ酸配列についてモチーフ解析をすると、MeER1 と同様に脊椎動物 ER の C ドメインと E ドメインを部分的に含んでいると推定された。MeER2 および MgER も MeER1 と同様に C ドメイン

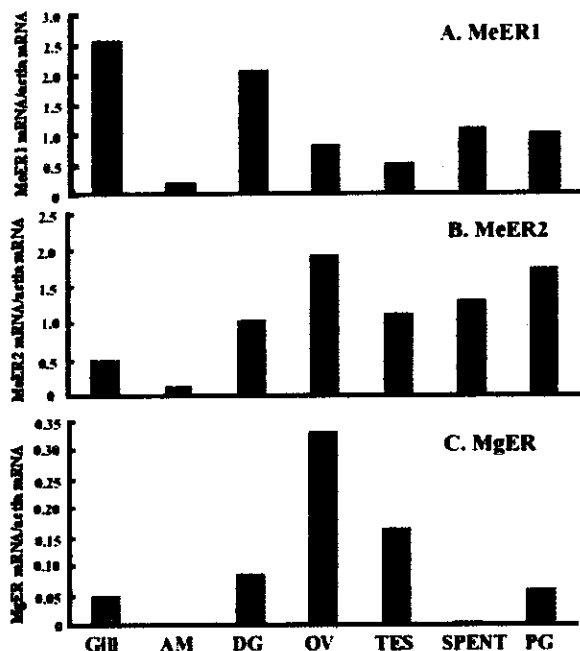


Fig. 3-12 RT-PCR for the (A) MeER1[AB257132], (B) MeER2[AB257133] and (C) MgER[AB257135] mRNA in various organs of *M. edulis* and *M. galloprovincialis*.

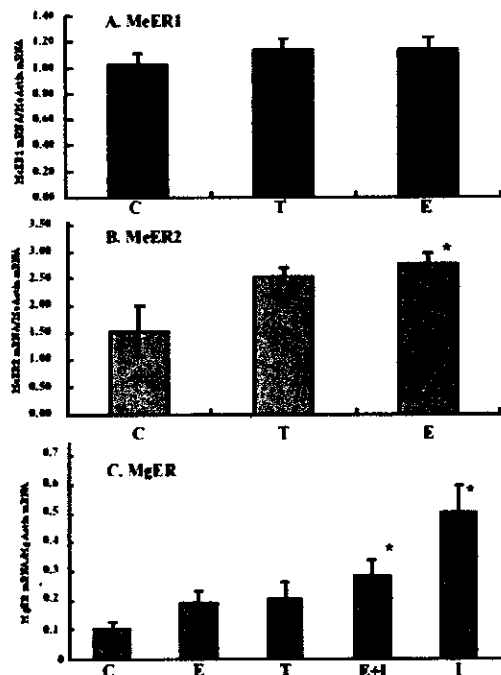


Fig. 3-13 *In vitro* effects of E<sub>2</sub> and E<sub>2</sub> antagonist ICI 182,780 on MeER1 (A), MeER2 (B), and MgER (C) transcription in the ovarian fragment of *M. edulis* and *M. galloprovincialis* cultured for 2 days.

E; estradiol-17 $\beta$ , T; testosterone; ICI 182,780

\*P < 0.05 significantly different from control.  
Each value indicates the mean  $\pm$  SE (n=4).

トである ICI 182, 780 と競合させた実験区、および ICI 182, 780 のみを添加した実験区では有意に発現量が高くなっていた。

対し、MeER1 は 36%の相同性を示した。

演繹アミノ酸配列を用いて分子系統樹を作成した (Fig. 3-4)。分子系統樹解析から ER は3つの大きなグループを形成した。MeER1、MeER2そして MgER は脊椎動物の ER  $\alpha$ 、ER  $\beta$ 、ER  $\gamma$  を含むグループとは異なる ERR のグループに属した。その中でも MeER1 は脊椎動物の ERR のグループに属し、MeER2 と MgER は MeER1 とは異なり PyER とともに同門のアメフラシ ER 等の軟体動物の ER と同じグループに属した。

MeER1、MeER2 および MgER の mRNA の組織内の発現を調べた (Fig. 3-12)。MeER1 mRNA は全組織で発現し、生殖巣よりも鰓や消化盲嚢で比較的強い発現がみられた。MeER2 mRNA は卵巣と足部神経節で他の組織と比較して強い発現がみられた。産卵後の生殖巣で成長期の卵巣での発現量よりは低いもののある程度の発現量がみられた。MgER mRNA の発現パターンは MeER2 と類似し比較的卵巣と精巣で強く発現していた。そして産卵後の生殖巣では発現がほとんどみられなかった。

イガイ類の卵巣組織系を用いてステロイド添加による MeER1 と MeER2、MgER mRNA の発現量を検討した (Fig. 3-13)。MeER1 mRNA の発現量はステロイド添加実験区でコントロールとほぼ同程度であり、ステロイド添加による効果はみられなかった。MeER2 mRNA 発現量はコントロールに対して E2 で有意に高くなった。テストステロン添加実験区でもコントロールと比較して発現量が高くなる傾向がみられた。MgER mRNA では E2 とテストステロン添加実験区でコントロールと比較して発現量が高くなる傾向がみられた。そして E2 のアンタゴニスト

## 考察

ホタテガイ卵巣組織培養系でE2添加した実験区ではVtg mRNAの発現量はコントロールとほぼ同程度で、これは内因性の卵巣に含まれるE2が十分量存在していたためではないかと考えられた。E2とアンタゴニストICI 182,780およびICI 182,780のみを添加した実験区では有意にVtg mRNAの発現量が低下したことは、アンタゴニストが、E2とERレベルで競合し、Vtg mRNAへの転写促進活性が阻害されたためであると考えられた。したがって、Vtg合成の場であるauxiliary cellに明らかにERが存在し、E2はこのERを介してVtg mRNAへの転写レベルの促進をすることが示唆された。これは第2章の結果と一致する。

PyER、MeER1、MeER2、MgERの部分塩基配列の演繹アミノ酸配列は、モチーフ解析から全てそれぞれER関連cDNAであると推定された。さらに相同性解析からPyER、MeER2、MgERは脊椎動物のchickenERより同門である軟体動物門のAplysiaERやOctopusERと高い相同性を有していた。一方、MeER1は同門の生物のERよりもヒトのEstrogen Related Receptor Gamma proteinやナメクジウオのestrogen receptor-related receptor short isoform proteinと高い相同性を有していた。得られたER関連cDNA間での相同性を比較した結果、MeER2とMgERはPyERと高い相同性を示したのに対し、MeER1はPyERと低い相同性を示し、MeER1はPyER、MeER2、MgERとは異なるタイプのERである可能性が考えられた。分子系統樹解析からPyER、MeER1、MeER2およびMgERは脊椎動物のER $\alpha$ 、ER $\beta$ 、ER $\gamma$ を含むグループとは異なり、原始的であるとされるERRのグループに属した。MeER1は脊椎動物のERRのあるグループに属したのに対し、PyER、MeER2、MgERはMeER1とは異なり同門のアメフラシERと同じグループに属した。これは相同性検索の結果と一致する。この分子系統樹での配置からヨーロッパイガイのERは2タイプ存在し、MeER1は脊椎動物のERRのグループに近縁なタイプであると考えられた。これまでに分子系統学による解析から、ERが属する核レセプターは6つのサブファミリーに分けられ、その中のサブファミリー3はERが属するNR3A、ERRが属するNR3B、その他のステロイドレセプター(Steroid receptor; SR)が属するNR3Cの3つのサブグループから成っている(The Nuclear Receptor Nomenclature Committee, 1999)。ERRはリガンドの発見されていない“オーファンレセプター”である。ERRでは哺乳類のモデルでERR $\alpha$ はエストロゲンシグナリングの阻害をするとされ、薬学的にはエストロゲンに関連した疾病に対する有効性が着目されたが、ERR $\alpha$ だけでなくERR $\beta$ やERR $\gamma$ を含めたERRに関しての知見は未だ十分に得られておらず、他の2つのサブグループであるERやSRとの系統学上の関係は未だ不明確である(Bardet et al. 2006)。近年、分子系統学の手法を用いた無脊椎動物の進化に関する研究が多数報告され、触手冠動物は単独の系統であるとされていたが18S rDNAを用いた分子系統学の解析から節足動物と新口動物を除いた触手冠動物、軟体動物、環形動物は共通の祖先から分岐したと考えられ、これらの動物門は“lophotrochozoa”と命名された(Halanych et al., 1995)。さらに節足動物と線形動物は18S rDNAの系統分析から脱皮をする動物である節足動物、緩歩動物、有爪動物、線形動物、類線形動物、動物動物、鯉曳動物等が含まれる“Ecdysozoa”という新しいクレードに属すると示唆された(Aguinaldo et al., 1997)。ER遺伝子は軟体動物のアメリアアメフラシで報告されたが、節足

動物のショウジョウバエ *D. melanogaster* や線形動物の *C. elegance* では報告されていない。Bardet et al., (2006) は ER が Ecdysozoa では欠損し、ERR 遺伝子がショウジョウバエ *D. melanogaster* には存在するのに対して線形動物の *C. elegance* には存在しないという点から、lophotrochozoa である軟体動物では ERR の存在はこれまでに報告されていないが、潜在的には ERR が存在するのではないかと推察した。本研究のヨーロッパイガイで ER に近縁なタイプと ERR に近縁なタイプの 2 種類の ER が存在するという結果は Bardet et al. (2006) の推察とも一致した。

PyER mRNA は全組織で発現し卵巣や精巣、そして CPG で発現がみられた。卵巣でみられた発現は第 2 章の抗ヒト ER 抗体を用いた免疫染色の結果から、卵母細胞の核と auxiliary cell で陽性反応がみられたこととも一致する。精巣での発現については、これまでに脊椎動物のマウスによる実験などから ER $\alpha$  KO マウスの実験で精子形成の低下がみられ、エストロゲンは雄にも必要であることが知られている (松本・加藤, 2001)。ホタテガイの雄では精巣まで運ばれた GnRH が生殖小胞の内側に沿って存在するエストロゲン合成細胞に働きかけのエストロゲンの合成を促すことで精原細胞増殖を促進することが推察された (中村, 2006)。そのため、精巣の PyER mRNA の発現は、精原細胞が増殖するためにエストロゲンシグナリングの受け手である ER を発現させていた可能性が考えられた。つまりホタテガイは ER を介したエストロゲンシグナリングによって雌雄の生殖に関与していることが示唆された。また、ホタテガイの頭部足部神経節である CPG においても発現がみられ、同じ二枚貝であるヨーロッパイガイの足部神経節において ER $\beta$  の存在が示唆されている (Stefano et al., 2003)。本研究ではヨーロッパイガイの足部神経節に MeER1 および MeER2 の mRNA が発現し、Stefano et al. (2003) の足部神経節に ER 様物質が存在するという結果と一致し、ヨーロッパイガイの足部神経節には mRNA およびタンパクレベルで ER 様物質が発現していることが明らかとなった。さらにホタテガイの CPG に PyER mRNA、ムラサキイガイの足部神経節に MgER mRNA 発現がみられたことから、ヨーロッパイガイだけではなく二枚貝に共通して中枢神経には ER 様分子が存在していることが強く示唆された。ホタテガイの腎臓にも PyER mRNA の強い発現がみられた。エストロゲンと腎臓の関係についてはヒトやラットでエストロゲンが腎臓に対し形態学的には退行変化を起こさせ、生化学的には多くの酵素系を抑制し、全体としてみると腎臓に対し抑制・保護作用を示していることがわかっている (玉舎, 2006)。二枚貝の腎臓の機能としてはヨーロッパホタテガイで産卵の際に生殖小胞でつくられた配偶子が生殖輸管を通して右の腎臓に入りそこから外界へと放出されることが示されているが (西脇ら, 1999)、それ以外については報告がほとんどない。ホタテガイの腎臓における強い ER mRNA の発現は、E2 が腎臓に何らかの作用していることが考えられるが、ホタテガイの腎臓の機能についての知見が少なく、E2 と腎臓の関係は今後の研究で明らかになっていくのかもしれない。

ヨーロッパイガイの ER mRNA の組織特異的な発現が MeER1 と MeER2 では大きく異なっていた。MeER1 mRNA は全組織で発現し、生殖巣よりも鰓や消化盲嚢で比較的強い発現がみられたのに対し、MeER2 mRNA は卵巣と足部神経節で他の組織と比較して強い発現がみられた。MgER mRNA の発現パターンは MeER2 mRNA の発現パターンと類似しており、比較的卵巣と精巣に強い発現がみられた。ヨー

ヨーロッパイギの卵巣と精巣では内因性のエストロゲンの存在が報告されている (De Longcamp et al., 1974 and Reis-Henriques et al., 1989)。MeER2 および MgER は卵巣や精巣などの生殖に関する器官で強い発現がみられことから、ヨーロッパイギとムラサキイギの内因性のエストロゲンは生殖巣にそれぞれ MeER2 もしくは MgER を介して生殖に関連して作用していると推察された。

PyER mRNAの発現量はE2の添加によりコントロールとほぼ同程度であったが、卵巣に内因性のE2が十分量含まれていたためではないかと考えられた。E2のアンタゴニストであるICI 182,780を添加した実験区、アンタゴニストのみを添加した実験区では、転写活性が促進される傾向がみられ、E2のアンタゴニストであるICI 182,780がアンタゴニストとしてではなくアゴニストとして作用したのではないかと考えられた。つまり、E2はERを介しそのER自体の転写を促すことで、脊椎動物に比べ分泌量の少ないエストロゲンのシグナルの増幅をはかっている可能性が考えられた。

MeER2そしてMgERのmRNAはE2の添加によりコントロールと比べ発現量が高くなる傾向がみられたが、MeER1 mRNAにはそのような傾向はみられなかった。MeER2やMgERは分子系統樹解析からPyERに近縁な軟体動物のERのサブグループに属するERであり、PyERと同様にE2がERを介しそのER自体の転写を促すことで、エストロゲンのシグナルの増強をはかっていると考えられた。一方、MeER1はPyERと異なり、機能の不明な脊椎動物のERRの含まれるサブグループに属し、エストロゲンのシグナルの増強ははかっているとはいえないと考えられた。ムラサキイギでも、ホタテイギと同様にE2のアンタゴニストがアゴニスティックに作用することが確認された。E2のアンタゴニストであるICI 182,780は哺乳類ではエストロゲンの純アンタゴニストとして作用するが、二枚貝のER mRNAの発現に関してはアゴニスティックに作用するのかもしれない。

本章の結果から、ホタテイギおよびイギ類のヨーロッパイギとムラサキイギにERが存在していることが明らかとなった。特にヨーロッパイギでは2タイプのMeER1とMeER2が存在する。分子系統樹の配置と相同性の比較から、MeER2、MgER、PyERはその他の軟体動物と同じグループを形成し、MeER1は機能の不明なERRのグループに属すると考えられた。組織特異性およびステロイド添加によるmRNA発現量の解析から、PyER、MeER2、MgERは主に生殖内分泌のコントロールをしているE2の受容体として機能している可能性が考えられた。ホタテイギではE2がERを介してVtg mRNAへの転写を促進していることが明らかであり、さらにE2はERを介しそのER自体の転写を促すことで、エストロゲンのシグナルの増強をはかっている可能性が示唆された。これはホタテイギがVtgの転写産物をE2によって単純に増やすだけではなく、受容体であるPyER自体を多く発現させてエストロゲンのシグナルの増強をはかり卵母細胞の成長期に対応していると考えられた。このエストロゲンのシグナルの増強はPyERと同じグループに属するMeER2とMgERにもみられ、同じ二枚貝のイギ類ヨーロッパイギとムラサキイギにもホタテイギと同様にMeER2とMgERを介したエストロゲンシグナリングとそのシグナルを増強する機構が普遍的に存在する可能性が考えられた。

## 5. ヨーロッパイガイへのエストロゲンのin vivo投与によるERとVtg遺伝子発現に対する影響

(Aquatic Toxicology, 79, 376-383, 2006)

これまで卵巣、精巣組織培養におけるエストロゲンの作用を明らかにしてきたが、ここでは飼育水へ添加した場合のERとVtg遺伝子発現に対する効果を検討した。

ヨーロッパイガイ *Mytilus edulis* を10日間、200 ng/Lの濃度の17 $\beta$ -エストラジオール (E<sub>2</sub>) 存在下で無給餌で飼育し、生体内に取り込まれるE<sub>2</sub>とエステル化E<sub>2</sub>の定量とエストロゲン応答遺伝子であるERとVtg遺伝子の発現量を調べた。飼育期間が進むに従ってエステル化E<sub>2</sub>がE<sub>2</sub>無添加の対照群に比べ15倍に増加したが、添加した遊離型のE<sub>2</sub>は全く増加しなかった。ERとVtg遺伝子の発現を飼育1〜3日、5、10日目に測定したが、雌雄いずれの生殖巣でも対照群に比べ有意な発現量の変化が見られなかった。

これらの事実は、ヨーロッパイガイの生体内にエストロゲンを一定レベルに保つ機構が働き、体外から取り込まれた遊離の過剰なエストロゲンが速やかにエステル化されることによってERに対する親和性を失わせ、結果としてエストロゲンシグナリングの下流にあるERとVtg遺伝子の発現誘導が妨げられたことを示唆している。この発見は、これらの遺伝子が内分泌攪乱化学物質のバイオマーカーとしての利用価値を議論させるものである。



本報告書収録の学術雑誌等発表論文は本ファイルに登録しておりません。なお、このうち東北大学在籍の研究者の論文で、かつ、出版社等から著作権の許諾が得られた論文は、個別に **TOUR** に登録しております。